

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1952-1953 N° 147

LE THIOMALATE DE SODIUM
DANS LES MILIEUX DE CULTURE
EMPLOYÉS EN BACTÉRIOLOGIE

T H È S E

présentée

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 7 Juillet 1953

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

V I A L Jacqueline

née le 21 Mai 1919

à NOGENT-EN-BASSIGNY



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen Honoraire : M. J. LEPINE
Doyen : M. H. HERMANN
Assesseur : M. J. GATE

Professeurs Honoraires

MM. NICOLAS, VILLARS, COLLET, CLUZET, BERARD, GUIART, PIERY, CADE, PATEL,
FAVRE, LEPINE, SAVY, TRILLAT, LERICHE, MOURIQUAND.

Professeurs

Clinique médicale A	MM. FROMENT
Clinique médicale B	P. RAVAUT
Clinique chirurgicale A	SANTY
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique ophtalmologique	BONNET
Clinique oto-rhino-laryngologique	REBATTU
Clinique urologique	CIBERT
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	DUFOURT
Clinique dermatologique et syphiligraphie	GATE
Clinique neuro-psihiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie	SEDALLIAN
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	GUILLEMINET
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Clinique stomatologique	DUCLOS
Clinique médicale infantile et hygiène du 1 ^{er} âge	BERNHEIM
Pharmacie et pharmacologie	LEULIER
Physiologie	HERMANN
Anatomie pathologique	J.F. MARTIN
Physique biologique, radiologique et physiothérapie	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Médecine du Travail	MAZEL
Parasitologie et pathologie exotique	GARIN
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	ROCHET
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Pathologie générale et expérimentale	JOSSE RAND
Hydrologie thérapeutique et climatologie	DELORE
Anatomie	GABRIELLE
Pathologie interne	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Pathologie chirurgicale	MALLET-GUY
Histologie	NOEL
Pharmacie galénique et matière médicale	REVOL
Médecine légale et déontologie	BOURRET
Thérapeutique	LEVRAT
Hygiène	SOHIER
Biologie médicale	JOURDAN
Propédeutique chirurgicale	BERTRAND
Botanique et cryptogamie	NETIEN

Professeurs titulaires sans chaires

Chimie organique et toxicologie	MM. BADINAND
Obstétrique	BANSSILLON
Pharmacie et pharmacologie	DREVON

Maîtres de conférences - Agrégés

Physique biologique	MM. BERGER
Parasitologie	COUDERT
Parasitologie	ROMAN
Histologie	TUSQUES
Bactériologie	BERTOYE A.
Physiologie	CHATONNET
Physiologie	CIER
Biochimie médicale	CREYSSEL R.

Agrégés en exercice

Pathologie médicale	MM. BRUN
	GIRARD M.
	GIRARD P.
	JEUNE
	VACHON
	GALY
	GONIN
Pathologie chirurgicale	BERARD
	DESJACQUES
	LABRY
	TRILLAT
	DARGENT
	MANSUY
	GUILLET
Orthopédie	MARION Joseph
Obstétrique	BROCHIER
	MAGNIN
	MATHIEU J.
Anatomie pathologique	GUICHARD
Anatomie	LATARJET
Urologie	PERRIN
Ophtalmologie	PAUFIQUE
Neuro-chirurgie	LECUIRE
Oto-rhino-laryngologie	MAYOUX
Dermato-syphiligraphie	THIERS
Médecine légale et médecine du Travail	ROCHE

Chargé des fonctions de Maître de Conférences Agrégé

Hygiène	M. BENAZET
---------	------------

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

A mon Mari

Aux Miens et à mes Amis

A V A N T - P R O P O S

Notre Maître dans les Hôpitaux et à la Faculté depuis de longues années, Monsieur le Professeur SEDALLIAN, après nous avoir donné de constants témoignages de bienveillance, nous a inspiré le sujet de cette thèse. Nous lui exprimons notre gratitude et l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

Nous remercions Monsieur le Professeur REVOL de l'amical accueil qu'il nous a toujours réservé et du grand honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail.

Au cours de notre Internat en Pharmacie et de nos stages médicaux, nous nous sommes souvent retrouvés avec grand plaisir dans le service hospitalier de Monsieur le Professeur Agrégé GUICHARD. Nous devons beaucoup à ce Maître compréhensif et accueillant. Qu'il trouve ici l'expression de notre vive reconnaissance et de notre fidèle dévouement.

Monsieur le Professeur Agrégé BERTOYE, après s'être intéressé à ce travail, a bien voulu faire partie de notre jury de thèse. Nous l'en remercions bien sincèrement.

Tous les travaux expérimentaux ont été exécutés sous la direction de Monsieur CARRAZ. Nous le remercions pour l'aide constante qu'il nous a apportée, et la patiente amitié avec laquelle il nous a guidés.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552307_0084

I N T R O D U C T I O N

A la suite de sa communication (69) "sur l'existence d'animalicules infusoires vivant sans oxygène libre et déterminant des fermentations", Pasteur isola rapidement d'autres micro-organismes capables de cultiver dans de semblables conditions. Aussi proposa-t-il dès 1863 "ces mots nouveaux aérobie et anaérobie pour indiquer l'existence de deux classes d'êtres inférieurs, les uns incapables de vivre en dehors de la présence de gaz oxygène libre, les autres pouvant se multiplier à l'infini en dehors du contact de ce gaz". (70).

Dès lors le but de tout procédé proposé pour isoler ou cultiver les bactéries anaérobies strictes est d'éliminer l'oxygène, soit par éviction physique ou chimique de ce gaz du voisinage des cultures, soit en s'opposant à son action par addition aux milieux nutritifs de produits divers d'origine biologique ou chimique.

Une étude des différentes méthodes montre qu'aucune ne semble supérieure aux autres mais que la technique de choix dépend des conditions de travail. Cependant celles qui, par simple adjonction de substance réductrice judicieusement choisie, permettent à la fois la prolifération des germes aérobies et anaérobies sur un même milieu, supprimant tout appareillage spécial et toute manipulation délicate, semblent recueillir l'adhésion du plus grand nombre des bactériologistes.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à l'étude d'un tel milieu mixte aéro-anaérobie de préparation simple et d'emploi commode.

P R E M I E R E P A R T I E

- Anaérobiose et thiomalate de sodium --

T I T R E I

EVOLUTION DE LA TECHNIQUE BACTERIOLOGIQUE VERS L'UTILISATION DES MILIEUX MIXTES AERO-ANAEROBIES

Au cours des premiers travaux concernant la culture des anaérobies, les auteurs emploient tout naturellement les méthodes physiques pour priver d'oxygène l'atmosphère au contact de leurs milieux nutritifs : Pasteur utilise le passage d'un courant gazeux (hydrogène ou gaz carbonique) pour entraîner l'air hors de ses tubes et ballons; d'autres chercheurs VIGNAL (90), GUILLE-MARD (42), FRAENCKEL (35), préconisent l'azote et même le gaz d'éclairage. ACHALME (1) désaère ses milieux par ébullition. Si le laboratoire est bien outillé, on emploie la trompe à vide.

Les cultures en milieu liquide ont lieu dans des appareils spéciaux. ROUX (80) en présente dès 1881 plusieurs modèles : les tubulures convenablement placées permettent l'introduction du bouillon, l'extraction ou la circulation des gaz. Depuis cette époque, de nombreuses variantes sont apparues. Parmi les plus récentes citons l'appareil de LEVITON (52) dont l'étanchéité est assurée par des soupapes à mercure, et le circuit complexe proposé par ANDERSEN (4) pour l'étude des métabolismes gazeux.

Plus simplement, quelques auteurs placent leurs milieux privés d'air en tubes dont la forme étroite assure une très faible surface de contact avec l'atmosphère : long tube de Veillon; tubes étranglés de Hall, de Jaubert et Gory, fermés d'une bille de marbre ou de verre. Un indicateur de réduction est incorporé au milieu; en général il s'agit d'un leucodérivé tel l'indigo blanc, premier utilisé à cet effet (PASTEUR - 71 -).

LIBORIUS (54) ensemence dans les couches inférieures d'un tube à essai rempli de gélatine et chasse l'air par un gaz inerte avant la fermeture.

Concurremment à ces techniques, la possibilité d'entraîner l'oxygène dans une combinaison chimique est elle aussi rapidement utilisée :

Les milieux liquides, ensemencés en tubes ordinaires, bouchés au coton, sont portés sous une cloche en présence des réactifs : acide pyrogallique et potasse (BORDET -12-), courant d'hydrogène en présence de catalyseur (FILDES -33a-), phosphore (Mc INTOSH -59-). KOLLATH et QUAST (48) placent la substance réductrice (sulfite de sodium) dans un tube spécial relié à celui où a lieu sa culture.

De la même façon, WERY (92) utilise des cellules de levure qui, en végétant, absorbent l'oxygène et dégagent CO₂.

D'un emploi également commode, les procédés biologiques acquièrent une faveur rapide et sont l'objet de nombreux travaux. La symbiose naturelle des anaérobies de la putréfaction avec les aérobies en est la base. PASTEUR pense que "l'action des anaérobies n'est possible que lorsque les bactéries aérobies leurs ont procuré le terrain nécessaire à leur développement par l'absorption de l'oxygène existant et l'éloignement de l'oxygène nouveau". Cette symbiose est réalisée in vitro (DEBRAUD -26-) à l'aide de *Bacillus subtilis*, isolé d'une infusion de foin, et de *Clostridium tetani*, recueilli dans la cour de l'Institut. D'un bouillon Liebig peptoné salé, ROUX obtient ainsi une culture abondante et une toxine active. Croyant à l'action mécanique du voile de *B. subtilis*, on emploie également le bacille pyocyanique et le bacille du rouget.

Par la suite BIENSTOCK (9) montre que le filtrat de culture du germe aérobie est actif et attribue ce rôle à un ferment.

Des produits variés non bactériens, tissus animaux ou végétaux, (GRIMBERT -40-, Mc CLUNG -57-) frais ou cuits, sont aussi actifs, et l'on utilise ainsi la viande hachée stérile pour la culture du vibrion septique, la purée de foie, des fragments de reins frais (TAPROZZI -64-), du sang, des exsudats leucocytaires stériles (GOLDIE -37-). Les Pharmacopées Internationale et Anglaise (72,16) ajoutent au milieu préconisé pour la recherche des micro-organismes aérobies, au fond du tube, sur une profondeur de un centimètre, un fragment de muscle coagulé par chauffage.

Comment agissent ces tissus ? Apport d'enzymes absents chez les anaérobies ? Entretien d'un potentiel d'oxydo-réduction favorable dans le milieu de culture (QUASTEL et STEPHENSON -75-, LEPPER et MARTIN -51-, FLOPZ et GELOSO -73-, DUBOS -29-, AUBEL -6-, FILDES -33b-, MESSING -66-) ? De très nombreux travaux sont consacrés à cette étude. WURMSER a suggéré que l'on pouvait considérer la croissance comme une suite de phénomènes d'oxydo-réduction et que le pouvoir réducteur du milieu intervenait peut être dans le déterminisme de ces synthèses.

Or, les propriétés réductrices des bouillons nutritifs peuvent être facilement modifiées par adjonction de produits chimiquement définis. Bien avant ces travaux TRENKMANN (87) cultivait des anaérobies en présence de sulfites alcalins avec de bons résultats. A sa suite, on proposa des substances

variées dans le but de simplifier la technique de culture : hydrates de carbone, certains alcools supérieurs, hydroxyacides (RITTER -79-); les nitrates mêmes favoriseraient la croissance anaérobie des aérobies facultatifs.

Au début de ce siècle CESARI et ALLEAUX (20) pensent que le bacille du rouget employé en symbiose avec les anaérobies "joue le rôle d'un minuscule appareil à hydrogène sulfuré dégageant H_2S à partir des peptones". Sur les conseils de NICOLLE, ils remplacent le bacille par du sulfure de calcium stérilisé par chauffage. "Ce composé ajouté à l'état de traces au bouillon Martin ou au milieu T permet le développement facile du bacille de la nécrose sans la moindre précaution..... la toxine obtenue dans ces conditions est aussi active que celle produite par le même germe cultivé sur bouillon Martin soumis à l'action du vide et de l'hydrogène".

En 1923, constatant dans les cultures de germes aérobies la présence de produits réducteurs, notamment l'acide pyruvique, PERTHELOT (8), par adjonction de ce corps, obtient des cultures de bactéries anaérobies en tubes ordinaires fermés au coton.

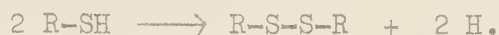
Les anaérobies stricts de la gangrène gazeuse sont par ailleurs (KOVACS -50-) cultivés en aérobiose sur bouillon peptoné glucosé additionné de 0,1 pour mille de diméthylparaphénylènediamine, ou encore de certaines quinones. Plus récemment, PPEVOT (74) préconise l'emploi du diénol de l'aldéhyde tartronique ou réductone. Isolé par V. EULER et MARTIUS qui l'obtiennent en chauffant les oses, ce corps apparaît naturellement au cours de la stérilisation à 100° des milieux de culture contenant du glucose. La réductose des brassours en contient de notables quantités. Pour plus de commodité on utilise ce dernier produit, facile à stériliser. Le service des anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris utilise cette réductone avec toutes satisfactions.

BONNEL (11) en 1950 fait connaître un milieu à l'hydrosulfite de sodium. Il lui permet de déceler les germes anaérobies qui aussi bien que les aérobies peuvent contaminer les denrées alimentaires.

L'industrie livre actuellement une résine synthétique "Duolite S10" insoluble, capable d'adsorber l'oxygène. MALIN et FINN (61) l'incorporent à un milieu peptoné et obtiennent des cultures abondantes.

En regard de ces produits variés, des essais nombreux sont réalisés à l'aide des thiols, corps caractérisés par leur fonction $-SH$ qui en fait

d'importants transporteurs d'hydrogène selon le schéma classique :



On a montré (LEPPER et MARTIN -51-) que les extraits d'organe et autres produits biologiques, étudiés précédemment, doivent à des systèmes réducteurs constitués par les corps sulphydrilés une part importante de leur activité.

Pour QUASTEL et STEPHENSON (75), la cystéine (qu'ils préconisent en même temps que les auteurs Japonais (HOSOYA SEIGO -45-) permet la croissance de *Clostridium sporogènes* à l'air libre grâce à l'oxydation de son groupement -SH, qui entretient un potentiel de réduction limite. Cette cystéine est également favorable à *R. tularensis* (RAUSMEIER et STEKOL -76-77-) qui l'utilise en la désulfurant. Le glutathion et l'acide thioglycolique ont une action similaire. AUBERTIN et GENEVOIS (7) proposent l'acide thiolactique. En 1940 BREWER (13) donne la formule d'un milieu très favorable à la croissance de *Clostridium novyi*, à base de thioglycolate de sodium :

Bouillon de viande	
Thioglycolate de sodium	0,1 %
Dextrose	1 %
Agar	0,05 %

Ce chercheur obtient la végétation d'anaérobies en surface sur le milieu gélosé suivant :

Milieu gélosé	
Thioglycolate de sodium	0,1 %
Formaldéhyde sulfoxyolate de sodium	0,1 %
Bleu de méthylène	0,0002 %

Après liquéfaction, le milieu est coulé en boîtes de Pétri et fermé hermétiquement par adhésion à la gélose du bord d'un couvercle spécial.

A la suite de ces publications, le thioglycolate voit son emploi en bactériologie se généraliser, tandis que l'acide correspondant liquide, de manipulation délicate, est abandonné.

Utilisés pour les hémocultures, les milieux au thioglycolate permettent d'après FALEY (32) d'isoler facilement les cocci à Gram positif, notamment les streptocoques, au cours des endocardites. Sur quatre vingts deux germes isolés du sang ou de lochies, dix sept le furent grâce au milieu de Brewer, car ils ne poussèrent pas sur gélose au sang ou bouillon en aérobie ou anaérobiose. (REID et BOWDITCH -78-).

Toutes les bactéries du genre *Clostridium* donnent une végétation appréciable sur les protéolysats de VERRA additionnés de thioglycolate (89).

La "Society of American Bacteriologists" (62) signale cette technique de Brewer comme pratique, simple, rapide, de lecture aisée, et en recommande l'emploi dans les laboratoires hospitaliers.

Le Codex Français 1949 introduit le thioglycolate dans le milieu destiné à l'essai de stérilité de la pénicilline. (24).

Quelques auteurs reprochent cependant au thioglycolate d'inhiber la croissance de certains germes aérobies et même d'anaérobies particulièrement difficiles, et de donner des résultats inconstants selon la composition des milieux. (ALESSANDRO et COMES -2-).

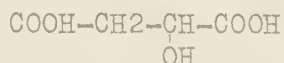
Les Pharmacopées Internationale et Anglaise admettent pour la recherche des micro-organismes anaérobies, en plus du milieu contenant un fragment de muscle précédemment décrit, un bouillon peptoné additionné de gélose et d'une substance convenablement choisie capable d'amener le potentiel d'oxydo-réduction à une valeur suffisante. La plus grande liberté est donc laissée quant au choix de cette substance réductrice.

P. SEDALLIAN, R. MARRAL, M. CARRAZ, M. ARCHINET et P. DETOLLE ont préconisé en 1949 l'emploi d'un produit voisin du thioglycolate, le thiomalate de sodium (81). C'est ce corps que nous étudions dans les pages suivantes.

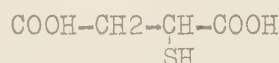
T I T R E II

LE THIOMALATE DE SODIUM

A l'acide malique, extrait en 1785 des fruits de sorbier par SCHEE-LE, correspond par substitution de la fonction -SH à la fonction -OH, l'acide thiomalique :

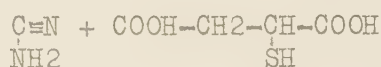
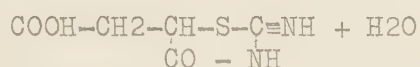


Acide Malique



Acide Thiomalique

L'un des plus anciens procédés de synthèse de cet acide consiste à chauffer à 115°, en milieu aqueux et en tube scellé, l'acide malique et la thiourée (ANDREASCH -5-). L'acide thiohydantoïnacétique obtenu, porté à l'ébullition en présence de baryte, se décompose en cyanamide et en acide thiomalique



D'autres techniques partent de dérivés de l'acide succinique, sulphydrilés ou non.

Diacide, l'acide thiomalique donne deux séries de sels. Nous utilisons le dérivé disodique :



C'est une poudre blanche, granuleuse, hygroscopique, très soluble dans l'eau, moins soluble dans les solvants organiques tels que l'alcool méthylique ou éthylique, l'acétone, pratiquement insoluble dans le chloroforme et le benzène.

Le thiomalate de sodium possède une odeur soufrée.

L'oxydation des solutions à l'air et à la lumière est rapide. A peine teintées en rosé lorsqu'elles sont fraîches, elles ne tardent pas à virer au violet brun.

En présence d'acide phosphotungstique il se développe une coloration bleue correspondant à la réduction du réactif selon la formule générale :



Cette réaction, appliquée au dosage colorimétrique de la cystine et de la cystéine par SHINOHARA et KASSEL (32-47), pourrait servir au dosage du thiomalate dans des conditions dont l'étude est en cours. Le titrage par la technique de désulfuration de ALMY (3) est longue et délicate; aussi serait-il avantageux de posséder une méthode simple et sélective, applicable aux solutions complexes que sont les milieux de culture microbienne.

Mis au point en France, à la suite des recherches anglo-saxonnes et belges sur les antidotes des arsines caustiques et des métaux lourds, le thiomalate de sodium est un détoxifiant très actif. Il doit cette propriété à sa fonction sulfhydryle libre, de même que l'acide thioglycolique ou le dithiol 2-3 propanol (British Anti Levisite), utilisés avant lui (DELGA -27-).

MEIDENGER (63-64-65) constate un effet protecteur remarquable du thiomalate de sodium contre les accidents oculaires dus aux sels mercuriques; effet protecteur également au cours de l'insuffisance hépatique expérimentale provoquée par le chloroforme et le tétrachlorure de carbone, et dans les intoxications plombiques,

THIERS et PELLERAT (86) l'emploient avec succès, en injections intra-musculaires ou sous-cutanées, dans le traitement des accidents cutanés de la chimiothérapie par les sels d'or, de bismuth et d'arsenic. Les accidents dont il est responsable sont rares et d'importance minime : céphalées, vertiges, sensation de chaleur dans la suite immédiate de l'injection, petites hématuries, érythème cutané passager.

Les propriétés anti-toxiques du thiomalate de sodium basées sur ses propriétés chimiques s'exercent également in vitro.

Les sels de mercure, employés à titre de désinfectants, enlèvent aux bactéries le pouvoir de se développer, en formant une combinaison : Hg-substance bactérienne à groupement-SH. Cette combinaison est réversible et détruite par apport de corps sulfhydrylés aux milieux contenant les germes en bactériostase. "Les bactéries ainsi réactivées sont de nouveau susceptibles de se multiplier". (GROSSAWICZ -41-).

Après le sulfure d'ammonium, l'hydrogène sulfuré, le thioglycolate de sodium, Jude et ses collaborateurs (68) emploient le thiomalate de sodium avec un égal succès.

Capable de rendre les mêmes services en toxicologie que le thioglycolate, nous avons cherché à la suite de SEDALLIAN et de ses collaborateurs cités plus haut si ce corps pouvait être utilisé avec un égal succès en bactériologie.

Nous avons vérifié la possibilité qu'ont les germes aérobies et anaérobies de se multiplier en sa présence par l'examen des cultures et l'étude de leurs courbes de croissance, comparant les résultats à ceux obtenus en présence de thioglycolate et de réductone.

Nous avons constaté que le thiomalate possédait d'intéressantes propriétés inhibitrices vis-à-vis de certains antibiotiques et anticoagulantes, déjà signalées pour d'autres dérivés sulphydrilés.

Nous avons enfin établi la composition d'un milieu au thiomalate de sodium d'utilisation courante, et avons démontré son intérêt pratique.

DEUXIEME PARTIE

- Travaux Expérimentaux -

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

P L A N D E T R A V A I L

TITRE I.

THIOMALATE DE SODIUM ET BACTERIES.

CHAPITRE I - Thiomalate de sodium et bactéries aérobies.

- 1 - Caractères des cultures.
- 2 - Etude des courbes de croissance.
- 3 - Détermination des concentrations inhibitrices.
- 4 - Essais de conservation.

CHAPITRE II - Thiomalate de sodium et bactéries anaérobies.

- 1 - Caractères des cultures.
- 2 - Etude des courbes de croissance.

TITRE II.

THIOMALATE DE SODIUM ET ANTIBIOTIQUES.

TITRE III.

THIOMALATE DE SODIUM ET COAGULATION SANGUINE.

TITRE IV.

RESULTATS OBTENUS DANS LES LABORATOIRES HOSPITALIERS PAR L'EMPLOI
DE MILIEUX AU THIOMALATE DE SODIUM.

CHAPITRE I - Milieux utilisés.

CHAPITRE II - Résultats obtenus dans la pratique des hémocultures.

CHAPITRE III - Résultats obtenus dans les cultures systématiques de produits
biologiques.

CHAPITRE IV - Résultats obtenus dans les essais de stérilité des ampoules.

T I T R E I

THIOMALATE DE SODIUM ET BACTERIES

CHAPITRE I

THIOMALATE DE SODIUM ET BACTERIES AEROBIES

1 - CARACTERES DES CULTURES -

Nous avons étudié comparativement la culture des germes aérobies en milieux simples usuels, et en ces mêmes milieux additionnés de thiomalate de sodium.

Les formules utilisées furent les suivantes :

Eau Peptonée (E.P.)

Peptone pancréatique de caséine (Roche).....	20 grammes
Chlorure de sodium	5 "
Eau	1 litre

Bouillon Ordinaire (B.O.)

Viande	500 grammes
Chlorure de sodium	5 "
Eau	1 litre

Eau Peptonée Thiomalatée (E.P.Th.)

Peptone pancréatique de caséine (Roche).....	20 grammes
Chlorure de sodium.....	5 "
Thiomalate de sodium	1 "
Eau	1 litre

Bouillon Thiomalaté (B.Th.)

Viande	500 grammes
Chlorure de sodium	5 "
Thiomalate de sodium	1 "
Eau	1 litre

Tous ces milieux, ajustés à pH 7,2, sont stérilisés à l'autoclave à 110° durant vingt minutes.

Les souches microbiennes nous ont été fournies soit par les collections de l'Institut Pasteur de Paris ou du Laboratoire de Bactériologie de la

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, soit par la Clinique des Maladies Infectieuses (souches fraîchement isolées).

Les milieux dont la stérilité avait été vérifiée par un séjour à l'étuve furent ensemencés à partir d'une culture de 24 heures en bouillon au placenta. Les tubes ensemencés furent portés à l'étuve à 37°.

Les résultats, consignés dans le tableau I, montrent que tous les germes étudiés poussent au moins aussi bien dans le milieu thiomalaté que dans le milieu usuel correspondant, l'importance de la végétation étant appréciée par turbidimétrie.

Les souches de streptocoques qui ne végètent pratiquement pas en E.P. donnent des cultures appréciables et d'aspect homogène en présence de thiomalate dans le milieu E.P.Th. Au microscope, une telle culture se montre constituée de très longues chainettes bien individualisées. Cette constatation nous a permis d'obtenir facilement des suspensions stables. A l'aide de sérum de lapin préparé avec le germe correspondant nous avons pratiqué des réactions d'agglutination de lecture aisée.

Les caractères biochimiques des germes sont inchangés après plusieurs passages sur milieu thiomalaté. Cultivés sur gélose au sang, au terme de ces passages, les streptocoques hémolytiques ou viridans donnent lieu à une hémolyse de même type ou à une modification pigmentaire de même nature, que celles produites par les cultures initiales.

En E.P.Th. plusieurs souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella* nous ont donné une production d'indol aussi fidèle qu'en E.P. Les colorations rouges obtenues en présence de réactif d'Erich sont comparables.

Le bacille de Loeffler pousse discrètement en B.Th. mais de façon plus appréciable qu'en B.O. Les germes voisins, bacilles d'Hoffmann et cutis commune se développent tout aussi bien sur l'un ou l'autre milieu.

Hemophilus influenzae ne donne lieu à aucune végétation appréciable sur B.O. ou B.Th. Mais, en ajoutant à l'un ou à l'autre une égale quantité d'extrait globulaire, ce bacille donne dans tous les cas une culture caractéristique en flocons extrêmement ténus.

Nous avons incorporé du Thiomalate de sodium aux milieux solides. Sur gélose la plupart des germes se développent aussi rapidement en présence

T A B L E A U I

DENOMINATION DES GERMES	ORIGINE	BOUILLON ORDINAIRE.	BOUILLON GLUCOSÉ.	BOUILLON + THIAMALATE 1 0/00	E A U PEPTONÉE	EAU PEPTONÉE + THIAMALATE 1 0/00
MICROCOCCLUS TÉTAGEUS	TÉTAGEUS SOUCHE 1.102	+		+		
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	STAPHYLOCOQUE DORÉ SOUCHE 1.047	++	+++	+++	+	
STAPHYLOCOCCUS ALBUS	STAPHYLOCOQUE BLANC SOUCHE 1.046	++	++	++	+	+
STAPHYLOCOCCUS	STAPHYLOCOQUE LONDRES SOUCHE 1.045	++	+++	+++	+	+
DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE TYPE I	COLL. INSTITUT PASTEUR PARIS	+	++	+	+	+
DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE	SOUCHE 182 (FALCOZ) (COLL. FAC)	+	++	+	+	+
STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS	β HÉMOLYTIQUE GORGE SCARLATINE (COQUERET)	+	++	++	-	+
STREPTOCOCCUS HAEMOLYTICUS	β HÉMOLYTIQUE SOUCHE 600 (PION LAPIN)	+	++	++	+	++
STREPTOCOCCUS VIRIDANS	SOUCHE 601 HÉMOCCULTURE GAMBIA	+	++	++	+	++
STREPTOCOCCUS FAECALIS	ENTEROCOQUE 524	+	++	++	+	+

STREPTOCOCCUS FAECALIS	ENTEROCOQUE LABORIE CLIN. HAL. INF.	++	+++	++	++	++
NEISSERIA MENINGITIDIS	MÉNINGOCOQUE B INT. PAST.	+	+	+	+	+
NEISSERIA GONORRHOEAE	GONOCOQUE INT. PAST.	—	+	+	+	—
BRUCELLA MELITENSIS	SOUCHE 162 (GERONAS)	+	++	+	+	+
BRUCELLA ABORTUS BOVIS	SOUCHE 155	+	++	+	+	+
BRUCELLA ABORTUS SUI	SOUCHE 156	+	++	++	++	+
LISTERIA	L. PAILLE SOUCHE 98	+	+	+	+	—
ERYSIPLOTHRIX	BACILLE DU ROUGET SOUCHE 94	+	+	+	+	+
CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE	BACILLE DE LOEFFLER CLIN. MALADIES INFECT.	+	+	+	+	—
CORYNEBACTERIUM XEROSE	SOUCHE 135	+++	+++	+++	+++	++
CORYNEBACTERIUM PSEUDODIPHTHERICUM	SOUCHE 140	++	++	++	++	++
BACILLUS ANTHRACIS	CHARBON SOUCHE 12	++	+++	+++	+++	+

PSEUDOMONAS AERUGINOSA	BACILLE PYOCYANIQUE SOUCHE 35	+++	++++	+++	+++	+++	+++
ESCHERICHIA COLI	SOUCHE 3.800	+++	++++	++++	++++	GAZ : + INDOL : +	+++ GAZ : + INDOL : +
ESCHERICHIA COLI	SOUCHE 3.804	+++	++++	++++	++++	PH 8 +++ GAZ : 0 INDOL : +	PH 8,5 +++ GAZ : 0 INDOL : +
KLEBSIELLA	AEROBACTER AEROGENES SOUCHE 3.801	++++ PH 7,6	++++	++++	++++ PH 7,6	+++ PH 6,7 INDOL : 0	+++ PH 6,8 INDOL : 0
KLEBSIELLA	AEROBACTER AEROGENES SOUCHE 4.043	++++ PH 8	++++	++++	++++ PH 7,9	+++ INDOL : +	+++ INDOL : +
KLEBSIELLA	PNEUMOBACILLE CHALAZION SOUCHE 16	++++	++++	++++	++++	+++ PH 7,2	+++ PH 7,5
SALMONELLA TYPHI	SOUCHE 3.113	+++	++++	++++	+++	++	++
SALMONELLA PARA TYPHI B	SOUCHE 3.110	+++ PH 8,05	+++	+++	+++ PH 8,05	++ PH 8,2	++ PH 8,5
SHIGELLA SONNEI	SOUCHE 3.700	+++	+++	+++	+++	++ PH 7,2	++ PH 7,2
SHIGELLA FLEXNERI	SOUCHE 3.704	+++	++++	++++	+++	++	++
SHIGELLA DYSENTERIAE	BACILLE DE SHIGA SOUCHE 3.703	+++	+++	+++	+++	++	++
PROTEUS VULGARIS	PROTEUS OX19 SOUCHE 3.753	+++ PH 6,8	+++	+++	+++ PH 7,2	+	++
PROTEUS VULGARIS	PROTEUS OX2 SOUCHE 3.754	++	+++	+++	++	+	+

LES MESURES DE PH ONT ÉTÉ EFFECTUÉES APRÈS 24 HEURES DE CULTURE À 37°

ou non de ce produit. Les colonies gardent le même aspect, la même taille, la même forme.

Quelques germes particuliers ont été testés sur milieux spéciaux, ceux utilisés pour leur isolement, en pratique courante.

Le bacille de Loeffler sur sérum de boeuf coagulé donne des cultures aussi abondantes en présence de 1 pour mille de thiomalate de sodium qu'en son absence. Il en est de même pour les bacilles pseudo-diphtériques. Les affinités tinctoriales ne sont pas altérées. Ces derniers gardent la coloration de Gram pour un temps de décoloration beaucoup plus long que *Corynebacterium diphteriae*. Les granulations caractéristiques subsistent.

Hemophilus Pertussis a été testé sur milieu de Bordet Gengou. La quantité voulue de thiomalate (1 pour mille) est incorporée au milieu sous forme de solution stérile en même temps que le sang, juste avant de couler en boîtes de Petri. Après ensemencement les colonies apparaissent en 48 heures nombreuses, régulièrement arrondies, luisantes et nacrées.

INFLUENCE DU THIOMALATE SUR LES PIGMENTS BACTERIENS.

Si l'aspect des cultures, en milieu liquide ou solide, n'est pas influencé pour la plupart des germes par la présence de thiomalate, les caractères pigmentaires sont, par contre, sensiblement modifiés.

CARRAZ (17) a déjà constaté l'augmentation de la pigmentation du staphylocoque doré, après plusieurs passages sur gélose au thiomalate. Des souches, nouvellement isolées dans nos expériences, se sont comportées de la même façon, donnant naissance à des colonies vivement colorées en jaune orangé.

La même constatation s'applique aux cultures de tétragène dont la pigmentation s'accroît sur gélose au thiomalate.

Par contre le pigment bleu de *Pseudomonas aeruginosa* disparaît rapidement sur un tel milieu. (CARRAZ -17-).

Nous avons tenté de vérifier ce fait à l'aide de la souche *Pseudomonas* 35 (Collection du Laboratoire de Bactériologie de la Faculté).

Nous avons utilisé d'abord une gélose ordinaire et un bouillon ordinaire, additionnés ou non de thiomalate, dans la proportion de 10 pour mille. Les tubes ensemencés sont laissés 48 heures à l'étuve à 37°. On remarque alors que seuls les géloses et bouillons sans thiomalate sont teints en bleu

vert. Les cultures cependant abondantes des bouillons et milieux thiomalates restent apigmentées, même après dix jours d'incubation à 37°.

L'emploi du milieu synthétique suivant nous a donné des résultats plus précis.

Succinate d'ammonium	0,75
Phosphate monopotassique	1
Phosphate dipotassique	0,50
Sulfate de magnésie	0,60
Eau bidistillée q.s.p.	250

On répartit en tubes contenant chacun 5 cm³ de milieu.

On ajoute au contenu d'une série de tubes ainsi préparés des doses croissantes de thiomalate; on ensemence chaque tube avec une goutte de culture de 24 heures sur milieu synthétique. On porte à l'étuve à 37° pendant 48 heures.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Concentration en thiomalate	0	1/100.000	1/10.000	1/5.000	1/1.000	2/1.000
Pousse	+	+	+	+	+	+
Coloration	Bleue	Bleue	Bleu-vert	Vert	Vert Jaune	Jaune

Concentration en thiomalate	5/1.000	10/1.000	50/1.000	60/1.000	100/1.000
Pousse	+	+	±	-	-
Coloration	Jaune Clair	Incolore	Incolore		

Il semble que de faibles concentrations n'inhibent pas la production de pigment bleu.

De 2 à 5 pour mille le thiomalate favorise la production de pigment jaune, aux dépens de la production de pigment bleu.

A partir de 10 pour mille apparaissent des races apigmentées.

De 50 à 100 pour mille, il y a inhibition de la culture.

Les souches apigmentées, repiquées sur gélose ordinaire, retrouvent progressivement leur aptitude à produire les pigments, après 2 ou 3 passages.

Signalons que les milieux à base d'acide malique favorisent l'apparition du pigment bleu.

UTILISATION DU THIOMALATE PAR LES BACTERIES.

Au cours des expériences précédentes nous avons recherché si certaines bactéries étaient capables d'utiliser le thiomalate en donnant naissance à des produits de dégradation acidifiant le milieu et susceptibles, de ce fait, d'être décelées par l'étude des variations de pH.

Le métabolisme bactérien de l'acide malique a suscité de nombreuses études. Selon le schéma classique, la dégradation de cet acide donnerait lieu à la formation d'acides oxalacétique, pyruvique, lactique et finalement d'acide acétique, de gaz carbonique et d'eau. Selon les germes étudiés et les conditions d'expérience, les auteurs retrouvent l'acide pyruvique (FOLPNESS et BEYERINCK -34-, LWOFF -55,56-) ou lactique (KORKES -49-), avec des intermédiaires variés. Ainsi le métabolisme de l'acide malique par les bactéries s'accomplirait suivant divers schémas, selon la richesse enzymatique des souches en cause et leurs facultés d'adaptation.

L'acide ~~thioglycolique~~ au contraire n'est utilisé que par un très petit nombre de micro-organismes et les cultures obtenues en employant cet acide comme source de carbone sont irrégulières. (QUASTEL et STEPHENSON -75-).

En ce qui concerne l'acide thiomalique, les mesures que nous avons effectuées à l'aide du potentiomètre de Jouan, système Carpeni-Constant, ne nous ont jamais montré d'acidification notable.

Il est possible que les micro-organismes ne soient capables d'utiliser le thiomalate qu'après désulfuration. Or, tandis que LEWIS et TARR pour la cystine (53-85), FROMAGEOT et ses collaborateurs pour la cystéine (28) et l'acide thiolactique (36) mettent en évidence la présence de désulfurases bactériennes spécifiques (chez *Escherichia coli* en particulier), les essais réalisés avec les acides thioglycoliques et thiomaliques demeurent le plus souvent négatifs (Mc LEOD et GORDON -60-, RANSMEIER et STEKOL -77-, P. CHAIX et P. FLAMENS -22-).

CONCLUSION

Un milieu de culture contenant 1 pour mille de thiomalate de sodium permet à tous les germes aérobies testés (choisis parmi les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine) de se développer.

Les caractères pigmentaires de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont différemment influencés, mais la vitalité des micro-organismes n'est pas altérée.

Il semble que la plupart des germes aérobies, capables de métaboliser l'acide malique, ne puissent utiliser le thiomalate faute de désulfurase spécifique.

2 - ETUDE DES COURBES DE CROISSANCE DES BACTERIES ATROPHES EN PRESENCE DE THIOMALATE DE SODIUM -

Cette étude nous a permis de comparer les modifications apportées aux courbes de croissance des germes aérobies par la présence de différents réducteurs dans les milieux nutritifs.

MILIEUX UTILISES.

Nous avons choisi des milieux aussi simples que possible afin de mettre plus facilement en évidence une action favorisante éventuelle. L'exigence de certains germes nous a toutefois amenés dans quelques cas à utiliser des milieux plus complexes. Quand nous l'avons pu, nous avons employé l'eau peptonée tamponnée pour éliminer les modifications de croissance dues aux variations de pH.

EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE :

Peptone pancréatique de caséine (Roche).....	20 grammes
Chlorure de sodium.....	5 "
Phosphate monopotassique.....	1 "
Phosphate dipotassique.....	2 "
Eau.....	1 litre

EAU PEPTONÉE GLUCOSÉE

Eau peptonée.....	1 litre
Glucose.....	5 grammes

BOUILLON PEPTONE

Viande hachée.....	500 grammes
Peptone.....	20 "
Chlorure de sodium.....	5 "
Eau.....	1 litre

Ces milieux sont ajustés à pH 7,2 et stérilisés à 110° pendant 20 minutes à l'autoclave.

EAU PEPTONÉE A L'EXTRAIT GLOBULAIRE

Eau peptonée stérile.....	100 CM ³
Extrait globulaire du commerce livré en ampoules stériles.....	5 CM ³

Dans le cas particulier de *Escherichia coli* nous avons utilisé le milieu synthétique indiqué par WOLKMAN (93) :

MILIEU M.S.

Chlorure d'ammonium.....	1 gramme
Sulfate de magnésium 7 H ₂ O.....	0,1 "
Chlorure de calcium.....	0,01 "
Sulfate ferreux.....	0,0003"
Phosphate disodique.....	1 "
Phosphate monopotassique.....	1 "
Eau bidistillée q.s.p.....	1 litre

Après stérilisation à 110° pendant 20 minutes, on ajoute une goutte de solution stérile de glucose à 20 % pour 5 cm³ de milieu. On obtient ainsi une concentration finale d'environ 2 pour mille.

Les réducteurs incorporés après répartition en tubes sont :

- le thioglycolate de sodium Difco
- le thiomalate de sodium Rhône Poulenc
- la réductone, fournie par l'Institut Pasteur de Paris.

Les deux premiers sont employés en solutions concentrées, stérilisées par filtration sur bougie Chamberland 5 L3; le troisième est présenté en ampoules scellées.

Des essais préliminaires nous ayant montré, dans plusieurs cas, une action inhibitrice du thioglycolate et de la réductone pour des concentrations voisines de 0,5 pour mille, nous avons adopté le taux uniforme de 0,3 pour mille. Toutefois, nous avons vu précédemment que le thiomalate ne gênait pas le développement des aérobies à la dose de 1 pour mille : aussi, à titre comparatif, avons nous adopté pour quelques germes un taux plus élevé de ce produit dans une expérience supplémentaire.

Les souches utilisées furent celles des collections précédemment étudiées.

Les mesures photométriques furent faites à l'aide de l'électrophotomètre Lumetron 401 A muni du filtre bleu 420 Å. Les cellules dans lesquelles se développent les cultures, et qui servent également à la lecture, sont fournies avec l'appareil : ce sont des tubes calibrés de 24 millimètres de diamètre.

TECHNIQUE.

Le milieu de base stérile (Eau peptonée tamponnée, glucosée, bouillon peptoné, M.S.) est réparti à la pipette, stérilement, à raison de

10 cm³ par tube calibré et additionné de la quantité nécessaire de réducteur. Pour chaque expérience, un tube témoin ne reçoit que le milieu de base. Un séjour de 24 heures à l'étuve, à 37°, permet de vérifier la stérilité.

Au début de l'expérience, chaque tube est ensemencé avec une quantité égale de culture de 24 heures du germe choisi, et agité. Après une première lecture électrophotométrique, ce tube est porté au B.M. à 37°.

Les lectures sont faites à intervalles réguliers (chaque fois après agitation) durant la période de croissance.

L'appareil est étalonné par rapport au milieu de base non ensemencé. Les mesures sont exprimées en densité optique.

RESULTATS.

Nos résultats sont consignés dans les courbes indiquées ci-après. Ces courbes sont établies en fonction du temps et de la densité optique. Leur étude entraîne, pour les différents germes étudiés les remarques suivantes :

Staphylocoques.

Nous étudions trois types : Staphylococcus Heatley (Souche 1045), Staphylococcus aureus (Souche 1047, présentant trois tests de pathogénicité positifs : coagulase, mannitol, hémolyse des globules de lapin), Staphylococcus albus (souche 1046).

On constate :

1°/ que le milieu au thiomalate de sodium est nettement favorable à la croissance de Staphylococcus Heatley et de Staphylococcus aureus; par contre, la courbe de croissance de Staphylococcus albus indique une action légèrement inhibitrice des trois réducteurs.

2°/ durant les phases de latence et logarithmique des deux premiers germes, le thiomalate de sodium se montre supérieur au thioglycolate de sodium.

3°/ la réductone ralentit la multiplication des trois germes.

Notons que dans les quatre milieux comparés, la croissance de Staphylococcus albus est inférieure à celle des autres types.

Pneumocoques. Type I

La croissance de ce germe n'est pratiquement pas influencée par la présence de réducteurs durant la phase de croissance et le début de la phase logarithmique. La fin de cette dernière phase est écourtée en milieu thiomalaté. Cette expérience est effectuée sur bouillon peptoné.

Streptocoques

Les germes sont étudiés sur eau peptonée tamponnée, milieu qui leur est généralement peu favorable. Nous observons ainsi :

1°/ Une accélération manifeste de la végétation à ses différentes périodes en présence de thiomalate de sodium à faible concentration (0,1 pour mille). En accroissant les doses, cette action favorisante se précise jusqu'à 5 pour mille, dose que nous n'avons pas dépassée.

2°/ L'emploi de quantités variables de réductone montre au delà ou en deçà de 0,3 pour mille une action inhibitrice. A cette concentration, par contre, correspond un heureux effet sur la phase de latence qu'elle diminue et la phase logarithmique.

3°/ Quelque soit le taux de thioglycolate, ce produit ne possède aucun effet accélérateur vis-à-vis des streptocoques.

4°/ Des souches provenant de très anciennes collections entretenues sur milieu gélosé ne répondent par aucune modification de leur courbe à la présence de réducteurs en eau peptonée tamponnée même glucosée.

Enterocoques.

L'étude de la courbe de *Streptococcus faecalis* nous montre une action favorable du thiomalate de sodium qui diminue la phase de latence, et une action inhibitrice tardive de la réductone : en présence de ce réducteur la croissance se termine plus brusquement. Le thioglycolate de sodium est sans action.

Brucella

Les trois souches (*Brucella melitensis*, n° 162, *Brucella abortus bovis*, n° 155, *Brucella abortus suis*, n° 156) sont étudiées en bouillon peptoné.

La croissance des deux premières souches présente peu de modifications en présence de réducteurs : *B. melitensis* se développe un peu plus en présence de réductone; *B. abortus bovis* est légèrement favorisé par le thioglycolate. Par contre *B. abortus suis*, après une longue phase de latence quelque soit le milieu utilisé, se multiplie beaucoup plus intensément dans le bouillon additionné de réductone.

Hemophilus influenzae.

Ce germe est cultivé en eau peptonée additionnée d'extrait globulaire.

En présence de chacune des trois substances étudiées, la culture se présente sous l'aspect de flocons très ténus plus abondants que sur le milieu de base. Les tracés des courbes mettent en évidence une action favorisant des thiols et particulièrement du thiomalate de sodium à 1 pour 1000.

Pyocyanique.

La croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (Souche n° 35), sur eau peptonée tamponnée, n'est pratiquement pas influencée par les réducteurs.

Escherichia coli.

Le comportement d'*Escherichia coli* (Souche n° 3800) diffère selon les milieux de culture :

1°/ En milieu synthétique M.S., la culture est très peu abondante et la sensibilité de notre électrophotomètre ne nous a pas permis d'apprécier des écarts notables d'opacité. En présence de thiomalate de sodium, la croissance est beaucoup plus importante, et, à une phase de latence courte, succède une phase logarithmique rapide. En faisant varier la concentration de ce produit de 0,3 à 5 pour mille, la densité optique atteint des valeurs de plus en plus élevées. Répétée en milieu thioglycolaté, cette expérience montre que c'est au taux de 0,3 pour mille que l'action du thioglycolate est la plus favorable.

La réductone se montre inférieure aux réducteurs précédents : la courbe obtenue en sa présence est moins élevée, et le temps de latence accru.

2°/ En eau peptonée tamponnée, la différence d'action des réducteurs est beaucoup moins nette qu'en milieu M.S. Il est possible que les substances organiques apportées par la peptone inhibent les thiols. (MALIN et FINN tirent argument d'un fait semblable contre le milieu de Brewer -61-).

Klebsiella et *Proteus*.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* (souche n° 16), d'*Aerobacter aerogenes* (souche n° 3801), de *Proteus* OX 19 (souche n° 3753), de *Proteus* OX 2 (souche n° 3754), nous ont donné constamment des résultats identiques en présence ou non de réducteurs.

Salmonella.

Salmonella typhi (souche n° 3113) présente une croissance inhibée

par la présence du thioglycolate, de la réductone, et (à un moindre degré) du thiomalate de sodium.

Salmonella paratyphi B (souche n° 3110) paraît insensible à la présence de ces réducteurs.

Shigella.

En bouillon ordinaire, comme en eau peptonée, *Shigella Sonnei* (souche n° 3007) est favorablement influencé dans sa croissance par le thiomalate de sodium.

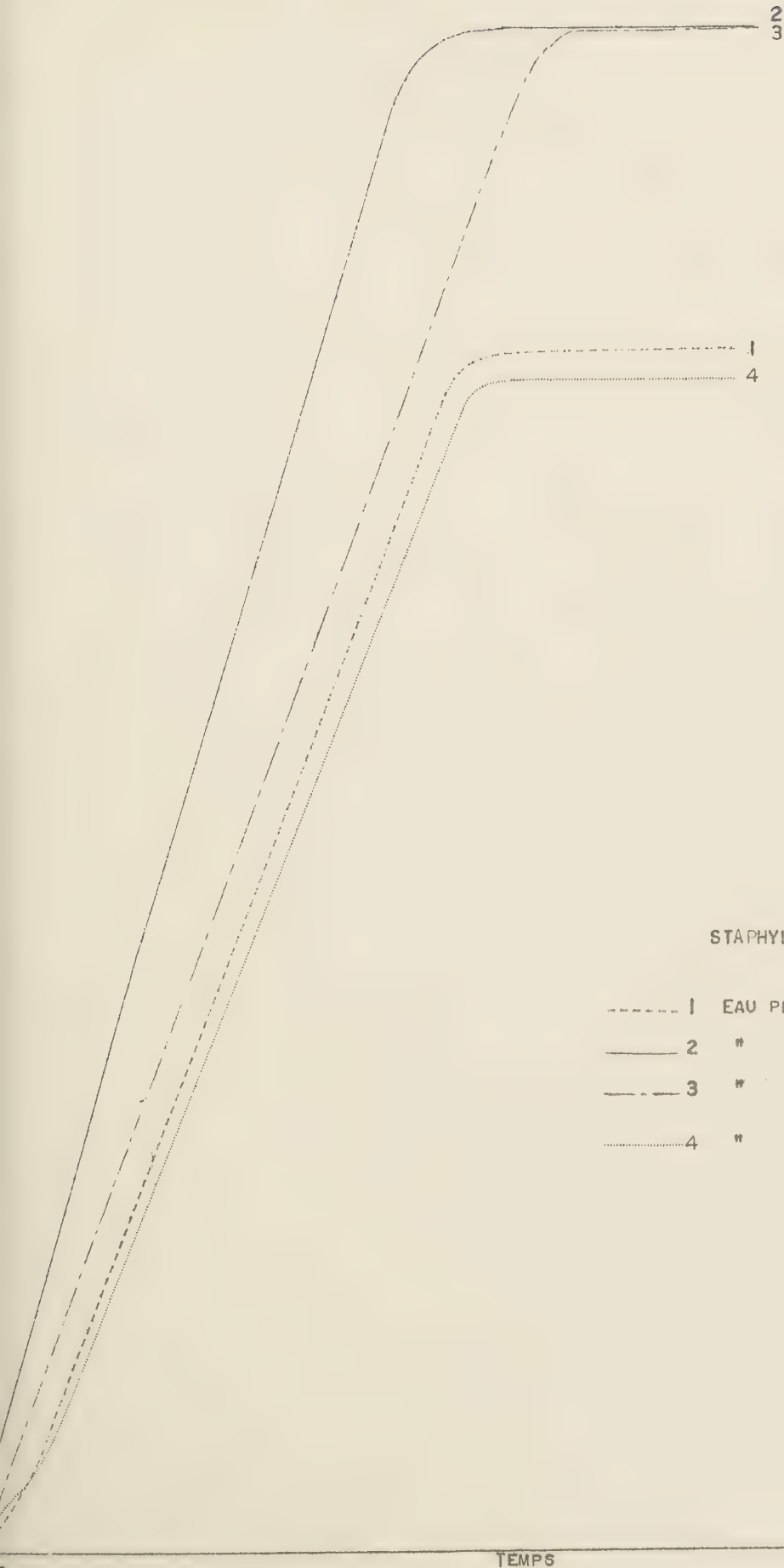
CONCLUSION

Les cocci à Gram positif des groupes streptocoques, enterocoques, et certains staphylocoques se multiplient plus rapidement et leur croissance maxima est plus importante en présence de thiomalate de sodium.

Favorable à *Shigella*, moins à *Salmonella typhi*, il est indifférent à d'autres enterobactéries.

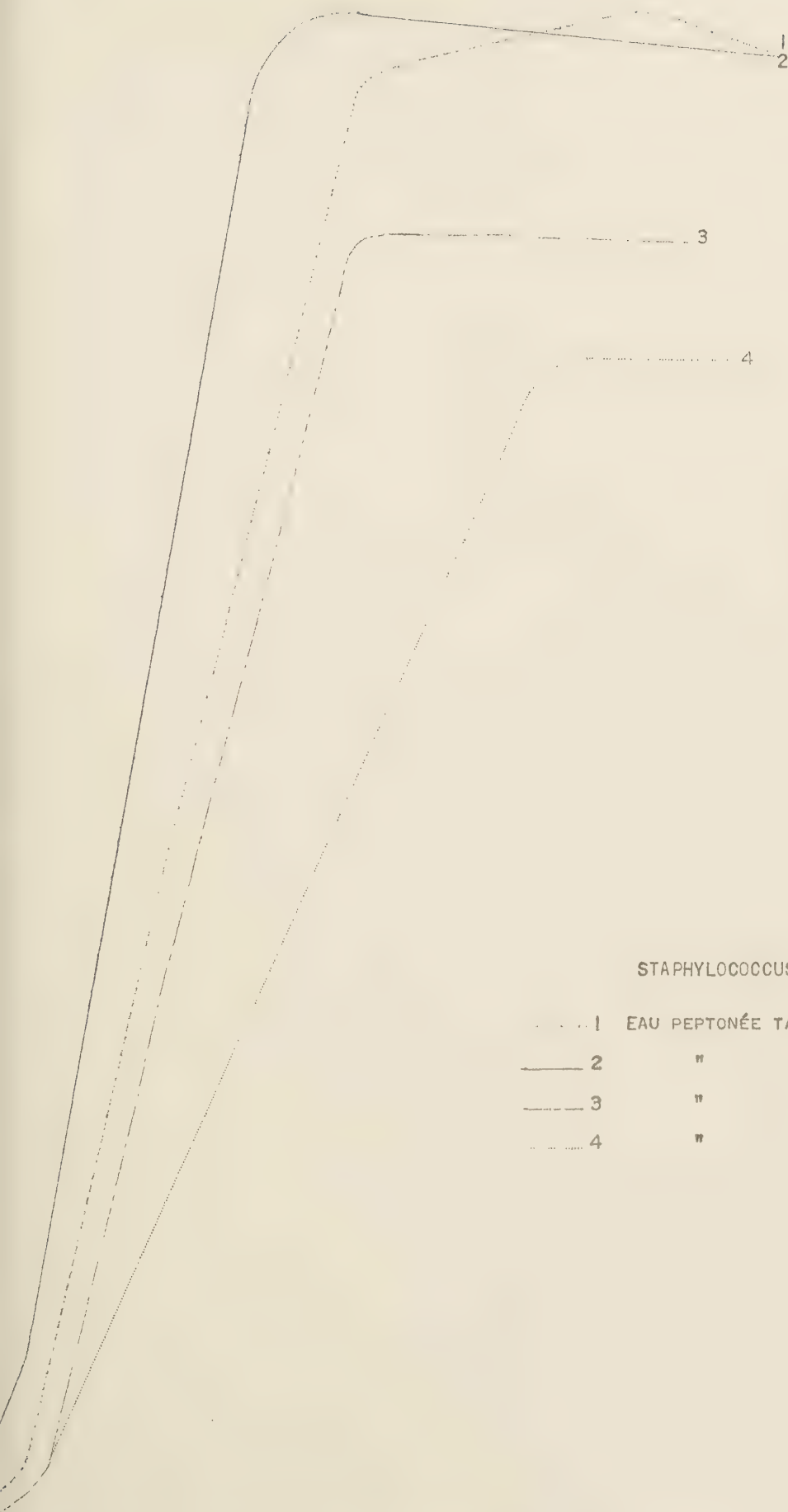
Il est probable que ces variations d'action sont en rapport avec la présence ou l'absence de certains enzymes chez les bactéries. On sait en effet que selon leur nature, les ferments sont tantôt activés tantôt inhibés par la présence de composés sulphydrilés. (NORDMANN -56-, CIARAUFU -23-).

D'une façon générale, le thiomalate de sodium présent dans les milieux de culture aux concentrations de 0,3 à 1 pour mille n'a pas d'action inhibitrice notable sur la croissance des germes aérobies examinés.



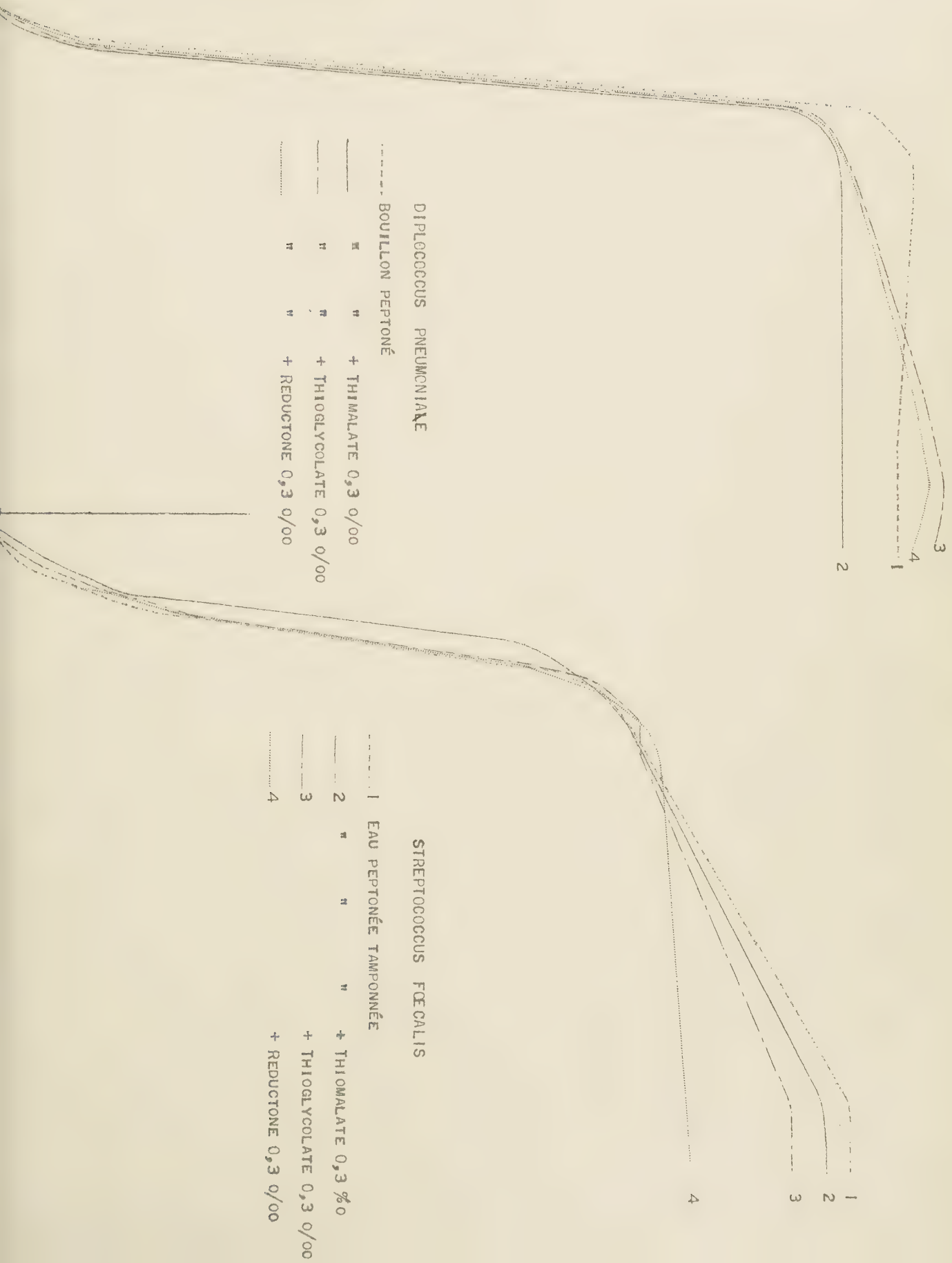
STAPHYLOCOCCUS HEATLEY

----- 1	EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE			
———— 2	"	"	"	+ THIAMALATE
— · — · 3	"	"	"	+ THIOLYCOLATE 0,3 0/00
..... 4	"	"	"	+ REDUCTONE



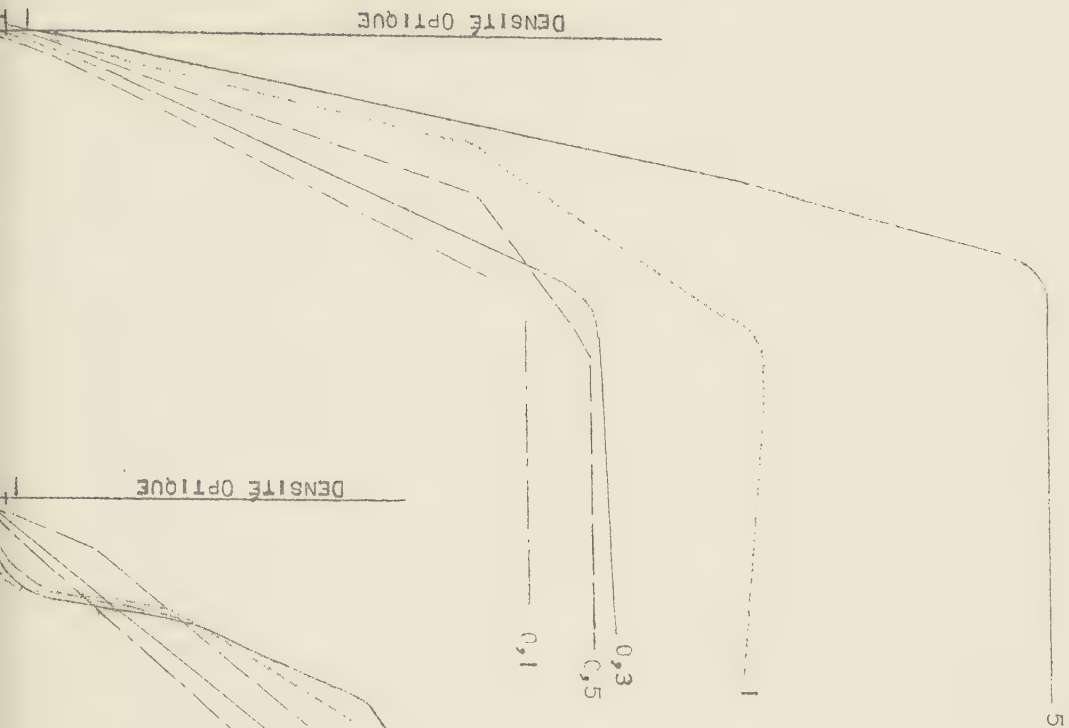
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

..... 1	EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE		
—— 2	"	"	+ THIAMALATE 0,3 0/00
— · — 3	"	"	+ THIOL ^{co} GLYATE 0,3 0/00
..... 4	"	"	+ REDUCTONE 0,3 0/00



DENSITÉ OPTIQUE

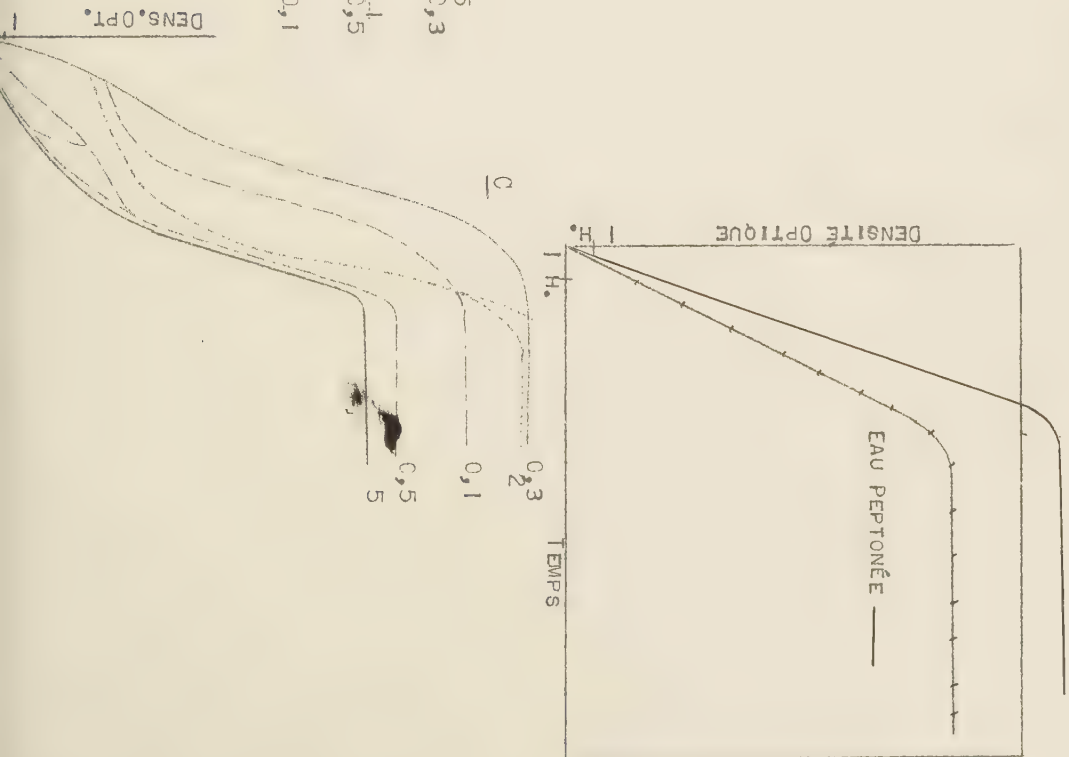
A



B



C



STREPTOCOCCUS VIRIDANS

E.P. CULTURE SUR EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE A THIAMALATE

"

"

"

"

+

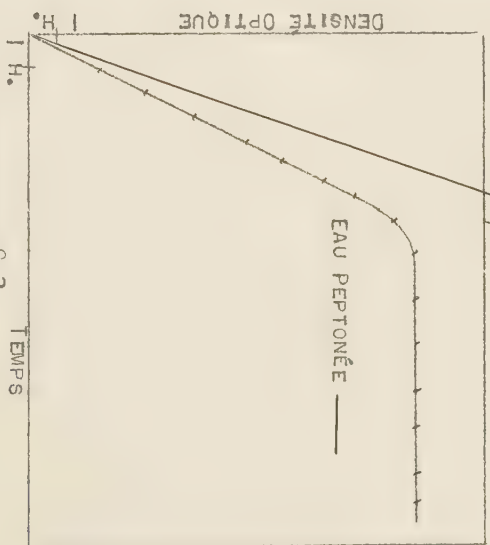
B THIOLYCOLATE

C REDUCTONE

MÊMES DOSES

0,1 0/00
0,3 0/00
0,5 0/00
1 0/00
5 0/00

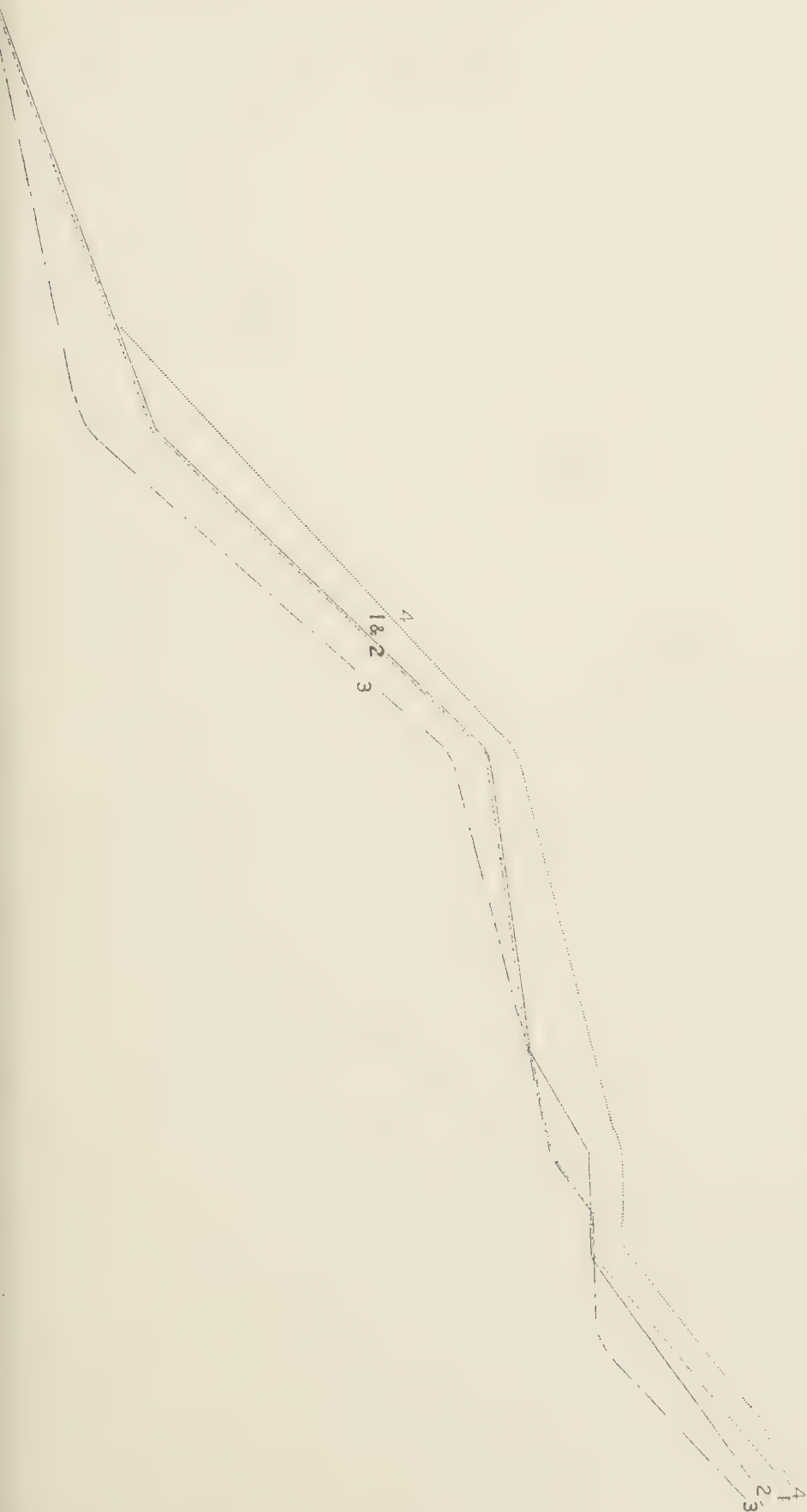
EAU PEPTONÉE —



BRUCELLA MELITENSIS

BOUILLON PEPTONÉ

1	"	"	+ THIOALATE 1 0/00
2	"	"	+ THIOLYCOLATE 0,3 0/00
3	"	"	+ REDUCTONE 0,3 0/00
4	"	"	



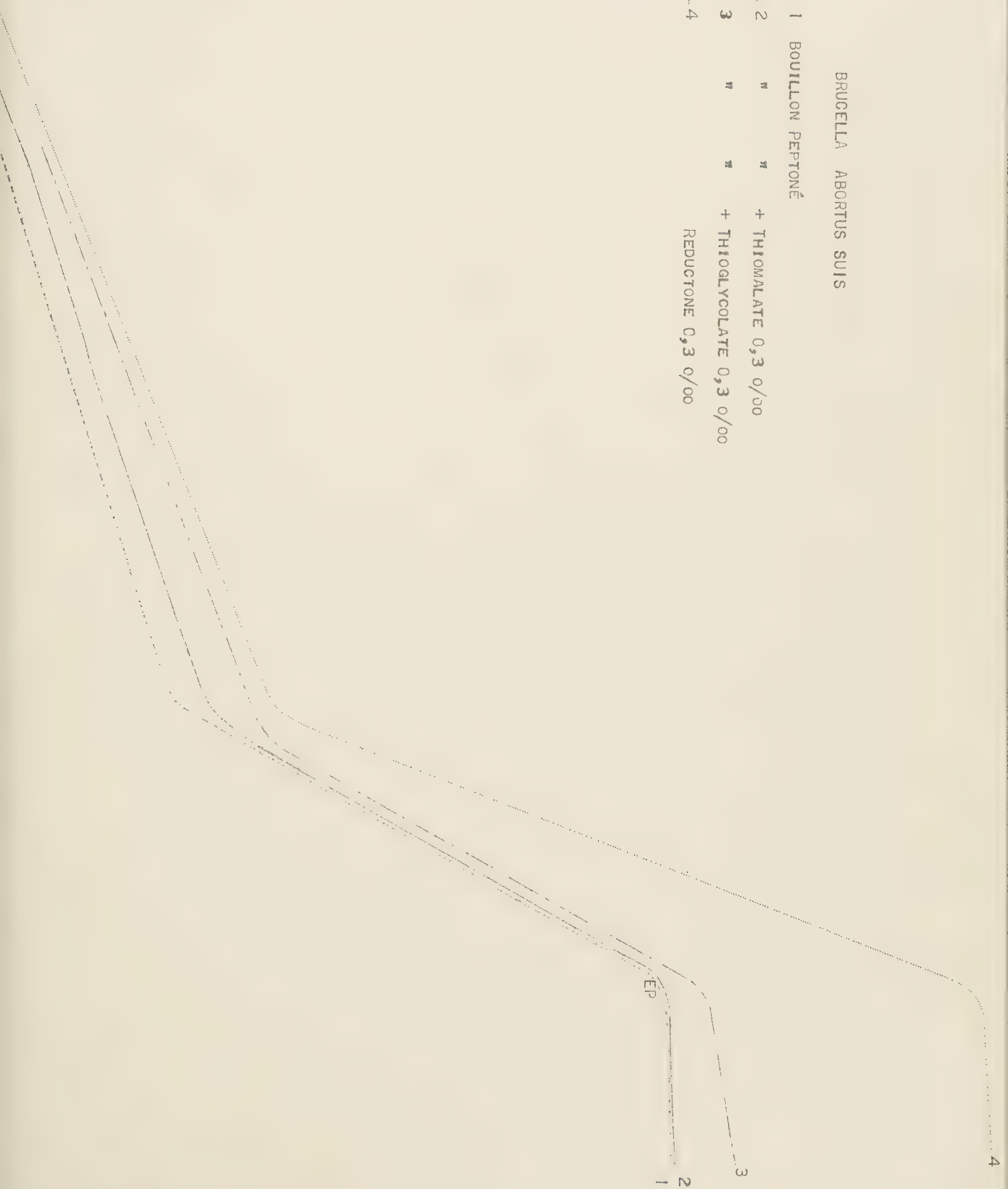
BRUGELLA ABORTUS SUI

1 BOUILLON PEPTONÉ

2 " " + THIAMALATE 0,3 g/100

3 " " + THIOLYCOLATE 0,3 g/100

4 " " REDUCTONE 0,3 g/100



HEMOPHILUS INFLUENZAE

1 33

1 EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE + 5 % D'EXTRAITS GLOBULAIRES

2 " " " " " + THIOALATE 0,3 0/00

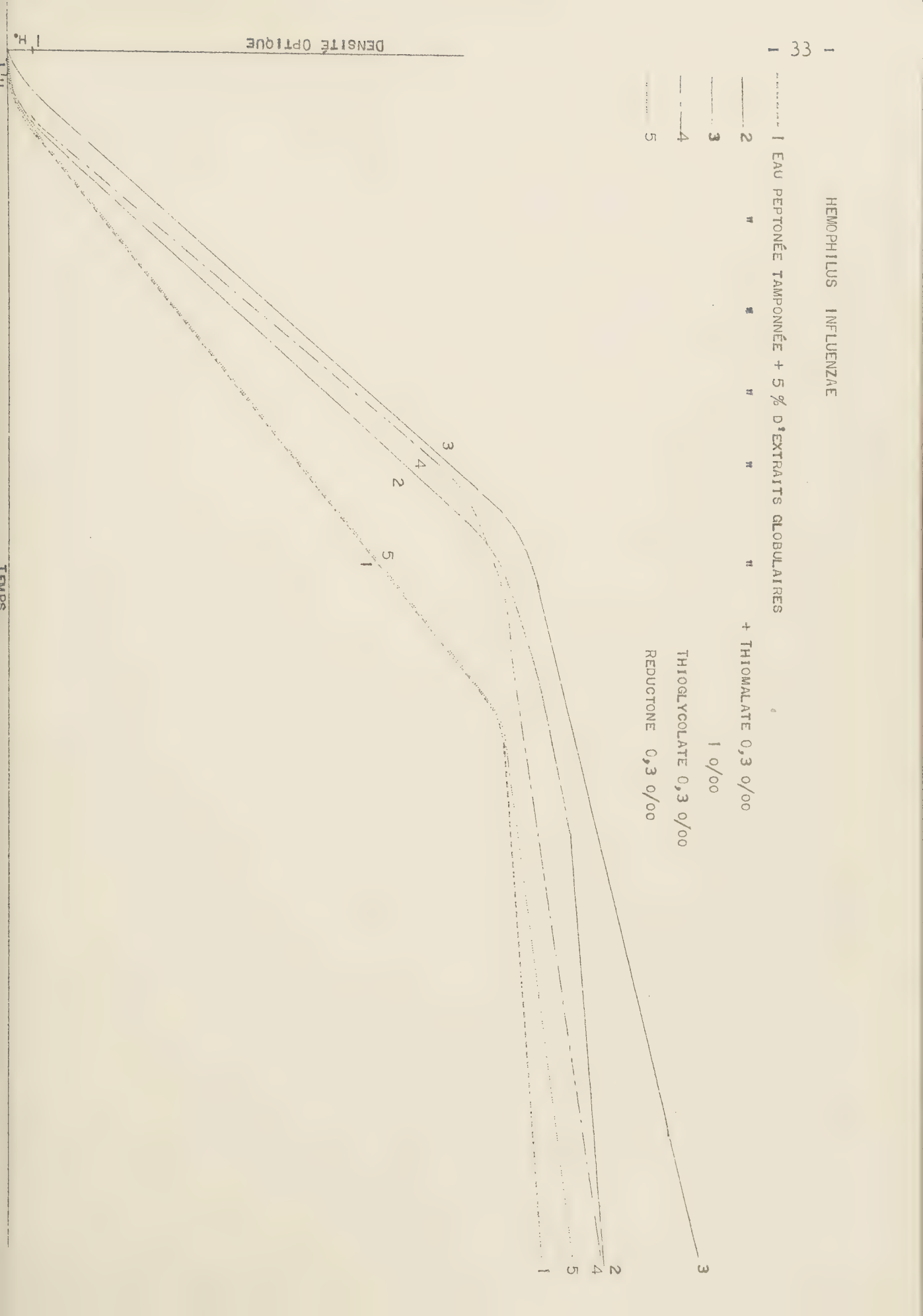
3 " " " " " + THIOALATE 0,3 0/00

4 " " " " " + THIOALATE 0,3 0/00

5 " " " " " + THIOALATE 0,3 0/00

THIOGLYCOLATE 0,3 0/00

REDUCTONE 0,3 0/00



ESCHERICHIA COLI

SOUCHE 3.800

MILIEU SYNTHÉTIQUE

- | | | | |
|-----|---|---|-------------------------|
| — 2 | " | " | + THIAMALATE 0,3 0/00 |
| — 3 | | | + THIOLYCOLATE 0,3 0/00 |
| — 4 | | | + REDUCTONE 0,3 0/00 |



SHIGELLA SONNEI

1 EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE

2

3

4

+ THIOMALATE 0,3 0/00

+ THIOGLYCOLATE 0,3 0/00

+ REDUCTIONE

1
2
3
4

DENSITÉ OPTIQUE

PSEUDOMONAS
PYOCYANAE

4
2
1
3

DENSITÉ OPTIQUE

SALMONELLA

TYPHI

EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE

36 1

2
3
4
5

+ THIOALATE 0,3 0/00

" 1 0/00

THIOGLYCOLATE 0,3 0/00

REDUCTONE 0,3 960

DENSITÉ OPTIQUE

DENSITÉ OPTIQUE

1.3

1
2-3

4

SALMONELLA PARATYPHI B

EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE

+ THIOALATE 0,3 0/00

THIOGLYCOLATE 0,3 0/00

REDUCTONE 0,3 0/00

3 - DETERMINATION DES CONCENTRATIONS INHIBITRICES VIS-A-VIS DE QUELQUES GERMES AEROBIES -

Les études précédentes nous ont montré que le thiomalate de sodium présent dans les milieux de culture n'influençait généralement pas le développement des germes aérobies aux concentrations de 0,3, 1 et même 5 pour mille. Cependant, si l'on augmente encore la proportion de ce sel dans le milieu, la croissance se ralentit et, pour un taux déterminé, variable selon chaque espèce, l'inhibition est totale.

Nous avons déterminé ce taux inhibiteur par la méthode des dilutions en bouillon.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

<u>G E R M E</u>	<u>DOSE INHIBITRICE EN G./Cm3.</u>
Streptococcus hemoliticus <i>S</i>	0,012
Streptococcus faecalis	0,015
Bacillus subtilis	0,03
Corynebactérium diphteriae	0,04
Pseudomonas aeruginosa	0,044
Salmonella paratyphi B	0,05
Staphylococcus Heatley	0,05
Klebsiella pneumoniae	0,06
Klebsiella aerobacter aerogenes	0,07
Staphylococcus aureus	0,07
Escherichia coli	0,12
Proteus vulgaris	0,13

Pour quelques germes nous avons incorporé le thiomalate à des milieux solides. Les résultats sont évidemment différents de ceux obtenus en bouillon où le contact est plus intime entre la bactérie et le thiol.

Sur sérum coagulé, les corynébactéries donnent des cultures d'égale abondance pour des taux en thiomalate de sodium s'étageant de 0 à 0,01 G./Cm3. Si l'on augmente encore ces taux les colonies deviennent moins denses.

Sur milieu de Bordet Gengou, Hemophilus pertussis ne semble pas souffrir de la présence de thiomalate pour des proportions de 0,001 à 0,003 G./cm3. A partir de 0,005 les colonies apparaissent en trois à quatre jours au lieu de 48 heures. Pour 0,01 la culture est à peine décelable.

Mycobacterium tuberculosis, testé sur milieu de Petraghiani, donne suivant les souches des résultats variables. Cependant toutes sont capables de se développer en 15 à 20 jours, en présence de 0,025 G./cm³ de thiomalate.

Les doses inhibitrices sont donc relativement élevées et les concentrations de thiomalate adoptées dans la constitution de nos milieux, voisines de 0,001 G./cm³, laissent une très large marge de sécurité.

4 - ACTION DU THIOMALATE DE SODIUM SUR LA CONSERVATION DE CERTAINS GERMES -

Nous avons vu en étudiant la croissance des germes aérobies que le thiomalate de sodium apparaissait comme une substance relativement favorable au développement des cocci à Gram positif.

Etant donnée l'importance de ces germes en pathologie humaine et, d'autre part, la fragilité de certains d'entre eux, il pouvait être intéressant d'essayer d'obtenir une meilleure conservation des souches par simple addition de ce sel aux milieux habituellement utilisés.

GERMES ETUDIES.

- 1/ Streptococcus hemolyticus, β hémolytique, souche 600 Pion lapin. Collection Faculté de Médecine.
- 2/ Streptococcus viridans, souche 601, hémoculture Gamba, collection Faculté de Médecine.
- 3/ Diplococcus pneumoniae type I, souche de l'Institut Pasteur.
- 4/ Diplococcus pneumoniae non typé, souche 182 Falcoz. Collection Faculté de Médecine.
- 5/ Streptococcus faecalis, souche 524. Collection Faculté; cette dernière souche douée d'une grande vitalité fut choisie dans un but comparatif.

MILIEUX UTILISES.

Nous avons étudié comparativement les milieux habituels : bouillon glucosé au placenta, milieu gélosé sucré au placenta, gélose au sang, additionnés ou non de thiomalate de sodium.

1°/ Bouillon Placenta Glucosé à 5 ‰ (B.G.)

2°/ Milieu gélosé selon la technique de HITCHENS (44) (M.G.)

Agar	0,05	gramme
Peptone pancréatique de caséine (Roche)	10	"
Maltose	10	"
Chlorure de sodium	5	"
Phosphate dipotassique	2	"
Bouillon placenta q.s.p.	1000	cm ³

Dissoudre dans une partie du bouillon et au B.M. d'une part la peptone, puis l'agar, d'autre part maltose, phosphate et chlorure. Mélanger les deux solutions. Ajuster à pH 7,2. Stériliser à l'autoclave.

3°/ Milieu gélosé au thiomalate de sodium (M.G. Th.)

Le thiomalate est ajouté au cours de la préparation du milieu soit sous forme de produit pur pulvérulent, soit sous forme de solution concentrée à 50 %. La quantité de thiomalate est de 1 gramme par litre de bouillon.

4°/ Gélose au sang frais (G.S.)

Gélose ordinaire fondue	100 cm ³
Sang frais défibriné de cheval	5 cm ³

5°/ Gélose au sang frais thiomalaté (G.S. Th.)

Gélose fondue	100 cm ³
Sang de cheval défibriné	5 cm ³
Thiomalate en solution aqueuse à 50 %	0,5 cm ³

Cette dernière solution est stérilisée par filtration sur bougie Chamberland 5 L 3. Le milieu ainsi obtenu présente généralement une teinte plus vive que le milieu G.S.

ENSEMENCEMENT.

Une culture de 24 heures de chaque germe en bouillon glucosé est diluée au centième dans du sérum physiologique stérile.

Les milieux liquides sont répartis en tubes à raison de 10 cm³ par tube, et ensemencés avec un cm³ de la suspension microbienne.

Les milieux solides reçoivent également un cm³ par inondation en surface.

Les tubes sont portés à l'étuve à 37° durant 24 à 36 heures.

CONDITIONS DE TEMPERATURE ET D'AERATION DURANT LA CONSERVATION.

Les tubes retirés de l'étuve sont répartis en deux lots. Les tubes du premier lot sont scellés à la flamme; ceux du second restent bouchés au coton. Une partie de chaque lot est ensuite portée à la glacière où elle sera conservée à + 6°, tandis que l'autre partie est abandonnée à la température du laboratoire et reste soumise à ses variations saisonnières, soit de 16 à 20° environ.

RESULTATS.

Des essais de repiquage sont faits à intervalles de plus en plus éloignés, aux 10^e, 20^e, 30^e, 40^e, 60^e, 120^e, 180^e, 240^e, 270^e, 300^e, 400^e, 630^e jours après le début de l'expérience.

T A B L E A U I I

			PNEUMO- COCCUS TYPE I	PNEUMO- COCCUS SOUCHE 182	STREPTO- COCCUS VIRIDANS	STREPTO- COCCUS β HÉMOL.	STREPTO- COCCUS FAECALIS
BOUILLON	6°	TUBES SCELLÉS	10 - 20	30 - 40	30 - 40	60 - 120	180 - 240
		TUBES NON SCELLÉS	10 - 20	30 - 40	40 - 60	60 - 120	525 - 630
GLUCOSE	18°	T.S.	10 - 20	20 - 30	10 - 20	10 - 20	60 - 120
		T. N.S.	< 10	10 - 20	10 - 20	< 10	270 - 400
MILIEU	6°	T.S.	30 - 40	30 - 40	60 - 120	60 - 120	400 - 525
		T. N.S.	10 - 20	30 - 40	60 - 120	60 - 120	400 - 525
G.	18°	T.S.	20 - 30	40 - 60	10 - 20	30 - 40	60 - 120
		T. N.S.	< 10	40 - 60	10 - 20	30 - 40	60 - 120
MILIEU	6°	T.S.	240 - 270	120 - 180	60 - 120	120 - 180	400 - 525
		T. N.S.	10 - 20	120 - 180	60 - 120	60 - 120	> 630
G. TH.	18°	T.S.	60 - 120	240 - 270	30 - 40	30 - 40	120 - 180
		T. N.S.	10 - 20	20 - 30	20 - 30	20 - 30	> 630
GELOSE	6°	T.S.	60 - 120	120 - 180	300 - 400	300 - 400	> 630
		T. N.S.	60 - 120	60 - 120	120 - 180	300 - 400	> 630
SANG	18°	T.S.	20 - 30	10 - 20	60 - 120	60 - 120	> 630
		T. N.S.	20 - 30	10 - 20	60 - 120	60 - 120	60 - 120
G.S. TH.	6°	T.S.	300 - 400	120 - 180	300 - 400	300 - 400	> 630
		T. N.S.	60 - 120	120 - 180	300 - 400	300 - 400	> 630
	18°	T.S.	60 - 120	60 - 120	60 - 120	300 - 400	> 630
		T. N.S.	20 - 30	20 - 30	60 - 120	60 - 120	60 - 120

1^{ER} CHIFFRE : DATE DE LA DERNIÈRE EXPÉRIENCE AYANT DONNÉ LIEU À DES CULTURES POSITIVES.

2^{ME} CHIFFRE : DATE DE LA PREMIÈRE EXPÉRIENCE AYANT DONNÉ LIEU À DES CULTURES NÉGATIVES.

Chaque échantillon est alors ensemencé sur bouillon glucosé, milieu gélosé M.G., milieu gélosé thiomalaté. Les cultures positives le furent constamment sur les deux derniers milieux, plus irrégulièrement sur B.G.

Lors des repiquages, nous avons ensemencé largement, soit un cm³ de culture liquide, soit le produit de raclage de toute la surface du milieu solide, pour un tube de milieu neuf.

Nous consignons les résultats de cette expérience dans le tableau n° II, où les chiffres indiqués correspondent au nombre de jours écoulés depuis le début de l'expérience. Nous ne sommes pas allés au delà du 630° jour : seul, à cette époque, *Streptococcus faecalis* était encore capable de se multiplier.

En ce qui concerne les pneumocoques : outre l'intérêt d'une basse température et de l'absence d'air, on peut noter l'avantage de la présence de thiomalate de sodium en milieu liquide dans trois cas sur quatre; résultats plus inconstants sur gélose où seul le pneumocoque type I végète encore après une année. A ce moment la culture obtenue dès le premier repiquage injectée à la souris provoque sa mort dans les 24 heures. Le sang renferme alors des diplocoques dont la capsule est facilement mise en évidence par les procédés habituels de coloration.

On peut dire également qu'en milieux thiomalaté, les chances de conservation des streptocoques sont augmentées. Nous avons vérifié que les caractères d'hémolyse étaient inchangés après 10 mois sur milieu G.Th. et G.S.Th. comme sur milieux G. et G.S.

L'enterocoque vit fort longtemps dans presque tous les cas; cependant l'influence favorable du thiomalate est nette en milieu liquide. Les tests biologiques utilisés pour l'identification de ces germes restent positifs : en particulier la fermentation de l'esculine et la pousse et le virage du milieu à l'azoture de sodium (Hajna-Perry).

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre que si les milieux gélosés sont favorables à la conservation des germes étudiés, l'adjonction de thiomalate facilite encore cette conservation.

CHAPITRE II

THIOMALATE DE SODIUM ET BACTERIES ANAEROBIES

1 - CARACTERES DES CULTURES DES GERMES ANAEROBIES SUR MILIEUX THIOMALATES -

Cherchant à constituer un milieu capable de permettre la culture du plus grand nombre possible de germes anaérobies, nous avons incorporé le thiomalate de sodium à divers milieux utilisés pour l'étude des aérobie. Nous avons comparé les résultats à ceux que donnent les mêmes milieux en l'absence de thiomalate.

Nous avons utilisé les milieux suivants :

Eau peptonée thiomalatée à 0,5 et 1 pour mille (E.P.Th. 0,5 et E.P.Thl.)

Bouillon au placenta peptoné (To.), additionné de diverses quantités de thiomalate :

0,25	pour mille	(T 0,25)
0,50	" "	(T 0,5)
1	" "	(T 1)
5	" "	(T 5)
10	" "	(T 10)
15	" "	(T 15)
100	" "	(T 100)

Gélose ordinaire thiomalatée à 1 pour mille (G.Th.)

Gélose molle thiomalatée (G.M. Th.)

Gélose	8 grammes
Peptone	20 "
Thiomalate	5 "
Bouillon placenta q.s.p.	1 litre

Stérilisation à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes.

Les milieux liquides sont répartis en tubes à essai ordinaires fermés au coton.

Les milieux solides sont coulés de la façon suivante : pour G.Th. 15 cm³ en tubes longs; pour G.M. Th. 3 cm³ en culot dans des tubes à essai ordinaires.

A partir d'une concentration suffisante (1 pour mille), la teinte violacée du thiomalate oxydé est appréciable à la surface des milieux. Ceci évite l'emploi d'autres indicateurs colorés de réduction.

DÉSIGNATION DES GERMES	ORIGINE	T ₀	T _{0,25}	T _{0,50}	T ₁	T ₁ (15 JOURS)	T ₅	T ₁₀	T ₁₅	T ₁₀₀	G.T.	G.M.T.
PLECTRIDIVM TETANI	SOUCHE 83	0			++	++	+++	+++	+++	0	+	0
WELCHIA PERFRINGENS	SOUCHE 60	0			+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	SOUCHE 75	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+
CL. SPOROGENES	SOUCHE 80	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. OEDEMATIENS	SOUCHE 65	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. HISTOLYTICUM	SOUCHE 71	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. HEMOLYTICUM	SOUCHE 86	0			+++	+++	+++	++	++	0	+	0
CL. CHAUVEI	SOUCHE 51	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. BOTULINUM A	INST. PAST.	0			+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. BIFERMENTANS	"	0	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. PUTRIFICUM	SOUCHE 50	0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. ACETOBUTILICUM	INST. PAST.	0	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. AEROFOETIDUM	"	0			+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
CL. PASTEURIANUM	"	0		++	+++	+++	+++	+++	+++		+	+
FUSOCILLUS GIRANS	"	0		+	++	++	++	++	++		+	+
SPHEROPHORUS FUNDULIFORME	"	0		++	++	++	++	++	++		+	+
SPHEROPHORUS NÉCROPHORUS	"	0		++	++	++	++	++	++		+	+
RISTELLA INSOLITA	"	0			++	++	++	++	++		+	+
RAMIBACTERIUM RAMOSOIDES	"	0		+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+
RAMIBACTERIUM RAMUSUM	"	0		+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+	+

LES SOUCHES NUMÉROTÉES PROVIENNENT DE LA COLLECTION DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE DE LA FACULTÉ, LES AUTRES NOUS ONT AIMABLEMENT ÉTÉ ENVOYÉES DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS PAR M. PRÉVOT QUE NOUS REMERCIONS.

Un certain nombre de souches testées se trouvaient au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine. La plupart nous ont été fournies par l'Institut Pasteur.

Les milieux dont la stérilité avait été vérifiée par un séjour à l'étuve furent ensemencés à partir d'une culture en bouillon au placenta peptoné sous huile. Les tubes ensemencés furent portés à l'étuve à 37°.

Les résultats de ces essais montrent, dans le tableau III, que toutes cultivent sur milieux où le thiomalate est employé comme seul facteur d'anaérobiose.

Le produit est déjà actif à la dose de 0,25 gramme par litre. Pour des concentrations plus élevées la végétation est plus rapide et plus abondante. Il ne semble pas y avoir intérêt à augmenter les doses au delà de 5 pour mille, taux pour lequel les cultures sont déjà extrêmement denses. Cependant les anaérobies se développent en présence de doses beaucoup plus importantes de thiomalate de sodium : à la concentration de 100 pour mille, *Cl. septicum* végète encore faiblement.

L'adjonction de thiomalate ne modifie pas le caractère particulier des germes :

La mobilité est conservée dans les milieux couramment employés contenant 0,5 à 2 pour mille de ce produit.

Les caractères tinctoriaux ne varient pas, notamment vis-à-vis de la coloration de Gram.

Les bactéries capables de sporuler le font avec la même facilité que dans les milieux anaérobies habituels.

L'aspect des cultures est conservé : c'est ainsi que *Pl. tetani* trouble le milieu liquide avant de donner un dépôt, et que *Cl. Chauvei* s'agglomère en amas visqueux.

La production de gaz n'est pas inhibée; nous l'avons retrouvée pour *Pl. tetani*, et pour *Cl. oedematiens* dans des milieux contenant jusqu'à 15 pour mille de thiomalate.

En gélose thiomalatée on reconnaît les colonies lenticulaires caractéristiques de *Cl. perfringens* ou spiralées des *Spherophoraceae*.

Le milieu contenant 1 pour mille de thiomalate se conserve bien. Agité chaque jour, puis ensemencé après deux semaines sans régénération préalable, il permet encore le développement de tous les germes testés.

2 - ETUDE DES COURBES DE CROISSANCE DES GERMES ANAEROBIES EN PRESENCE DE THIOMALATE.

Comme nous l'avons fait pour les germes aérobies, nous comparons dans cette étude l'action du thiomalate et du thioglycolate de sodium ainsi que de la réductone.

Les milieux utilisés sont :

- L'eau peptonée tamponnée
- Le bouillon de viande peptoné
- Le bouillon V.F. dont la préparation comporte les deux étapes suivantes :

a) Hydrolyse pepsique de viande :

Chair musculaire hachée et dégraissée.....	3,7 Kgs.
Foie de bœuf haché	1 Kg.
Acide chlorhydrique pur	150 Cm ³
Pepsine Vaillant titre 500	10 G.
Eau	18 litres

L'eau versée dans un récipient en porcelaine, est chauffée et maintenue à la température de 50°. On y ajoute la viande, le foie, l'acide et la pepsine préalablement dissoute dans de l'eau. Cette hydrolyse dure 18 heures. On détruit ensuite le ferment par chauffage à 85° durant 15 minutes. Le liquide de digestion, refroidi et décanté, est réparti en ballons.

b) Préparation du milieu :

Bouillon d'hydrolyse pepsique	1 litre
Gélose lavée (selon la saison)	7,5 à 8 grammes
Glucose	2 "

Alcaliniser le bouillon à pH 7,4 après chauffage à 80°. Ajouter la gélose. Précipiter à 118° durant 30 minutes. Incorporer le glucose. Filtrer sur papier Laurent mou (ou Chardin), puis dur. Répartir en tubes étroits. Stériliser à 110°.

A ces milieux, nous avons incorporé les réducteurs sous forme de solution, aux doses de 0,3 gramme par litre pour le thioglycolate et la réductone, et de 0,3 et 1 gramme par litre pour le thiomalate de sodium.

Nous avons été amenés à choisir ainsi ces doses par des expériences préliminaires effectuées sur *Cl. perfringens*. La pousse de ce germe en présence de thioglycolate, de réductone et de thiomalate a été étudiée pour des concentrations de ces corps variant de 0,3 à 5 pour mille. Les différences de densité des cultures sont établies par lecture photométrique, comme dans nos expériences sur les germes aérobies.

En présence de réductone, toute concentration supérieure ou inférieure à 0,3 pour mille ne peut assurer une végétation égale à celle qui se développe dans le même milieu de base, sans réducteur, sous huile.

En présence de thioglycolate, le départ est un peu plus précoce dans le milieu à 1 pour mille; mais finalement c'est pour une concentration à 0,3 pour mille que l'on obtient, là encore, les cultures les plus denses à la phase maxima. A noter toutefois que, pour ce réducteur la végétation est toujours supérieure (pour les concentrations de 0,1 à 5 pour mille envisagées) à celle obtenue sur le milieu de base, sous huile.

Au contraire, en milieu thiomalaté, plus la concentration augmente, plus la croissance est rapide et au total plus abondante.

Si nous comparons pour ce germe les courbes de croissance obtenues en présence des concentrations, qui d'après l'expérience précédente seraient les plus favorables pour cette souche, nous constatons que la végétation relativement lente en eau peptonée tamponnée sous huile, est légèrement accélérée durant la phase logarithmique par la réductone, mais que les autres réducteurs sont beaucoup plus favorables. En particulier, en milieu thiomalaté, la phase de latence est diminuée de plusieurs heures, tandis que la phase logarithmique représentée par une droite très relevée traduit une multiplication intense des bactéries.

D'une façon générale, comme on peut le voir d'après les courbes de croissance représentées plus loin, tous les germes anaérobies dont nous avons suivi le développement, se multiplient mieux en milieu aéré et additionné de réducteurs actifs que sur le milieu de base conservé sous huile et régénéré avant l'emploi. Les courbes obtenues pour *Clostridium Chauvei*, *Clostridium Pasteurianum*, *Spherophorus necrophorus* en sont des exemples.

Toutefois certaines souches se sont montrées particulièrement peu favorisées par la présence de thioglycolate de sodium, tel *Clostridium histolyticum*, ou *Clostridium sporogenes* dont la phase logarithmique de croissance est accélérée par la réductone et dont la croissance maxima est surtout importante en milieu thiomalaté. On a même conseillé (Mc CLUNG -56-) de ne pas employer le milieu de Brewer pour quelques germes parmi lesquels *Clostridium acetobutylicum*. De fait la souche de cette espèce dont nous disposons ne végète pas sur bouillon V.F. additionné de thioglycolate ou même de réductone. Elle

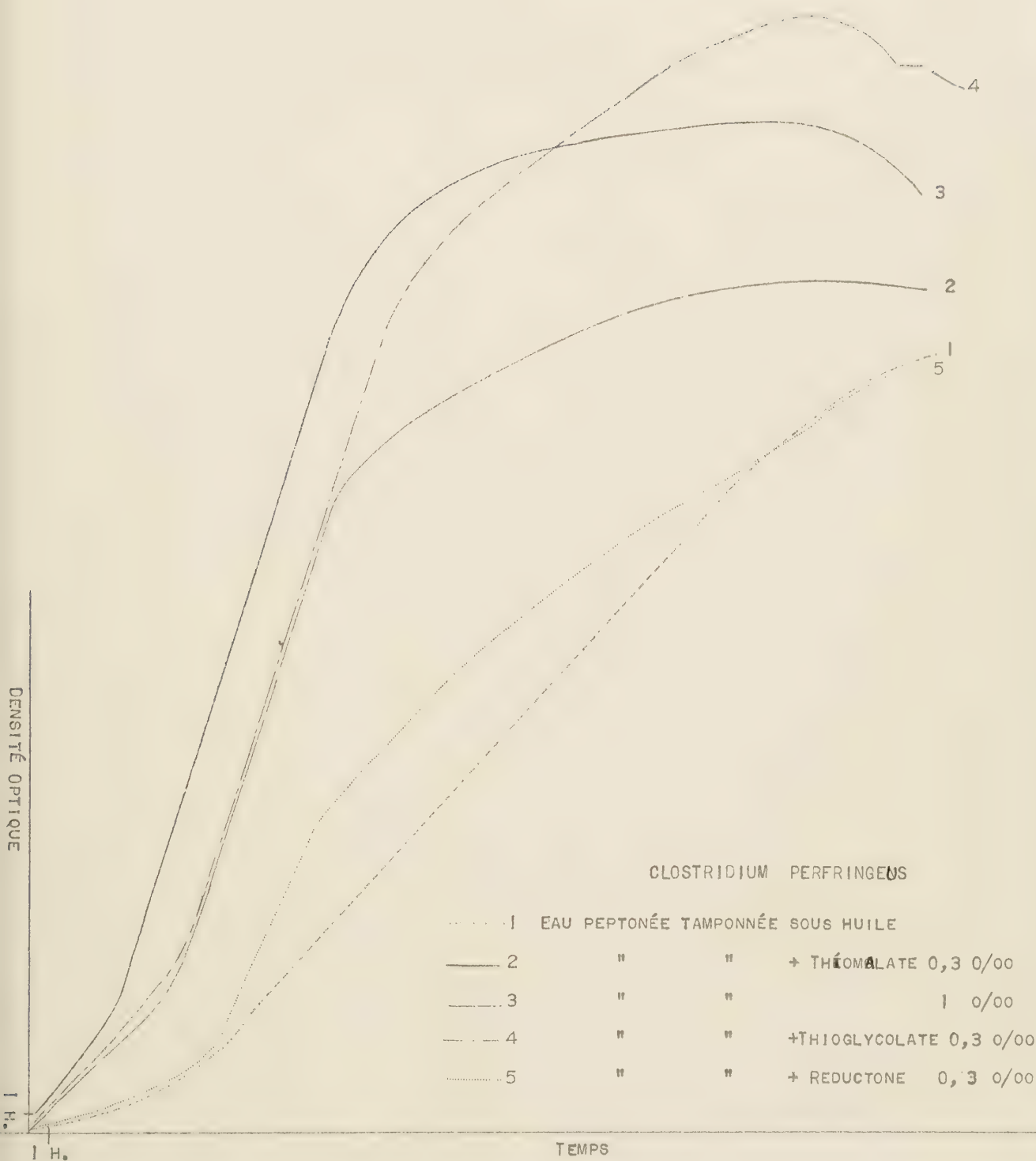
se développa par contre facilement sur ce milieu sous huile ou mieux encore thiomalaté et à l'air libre.

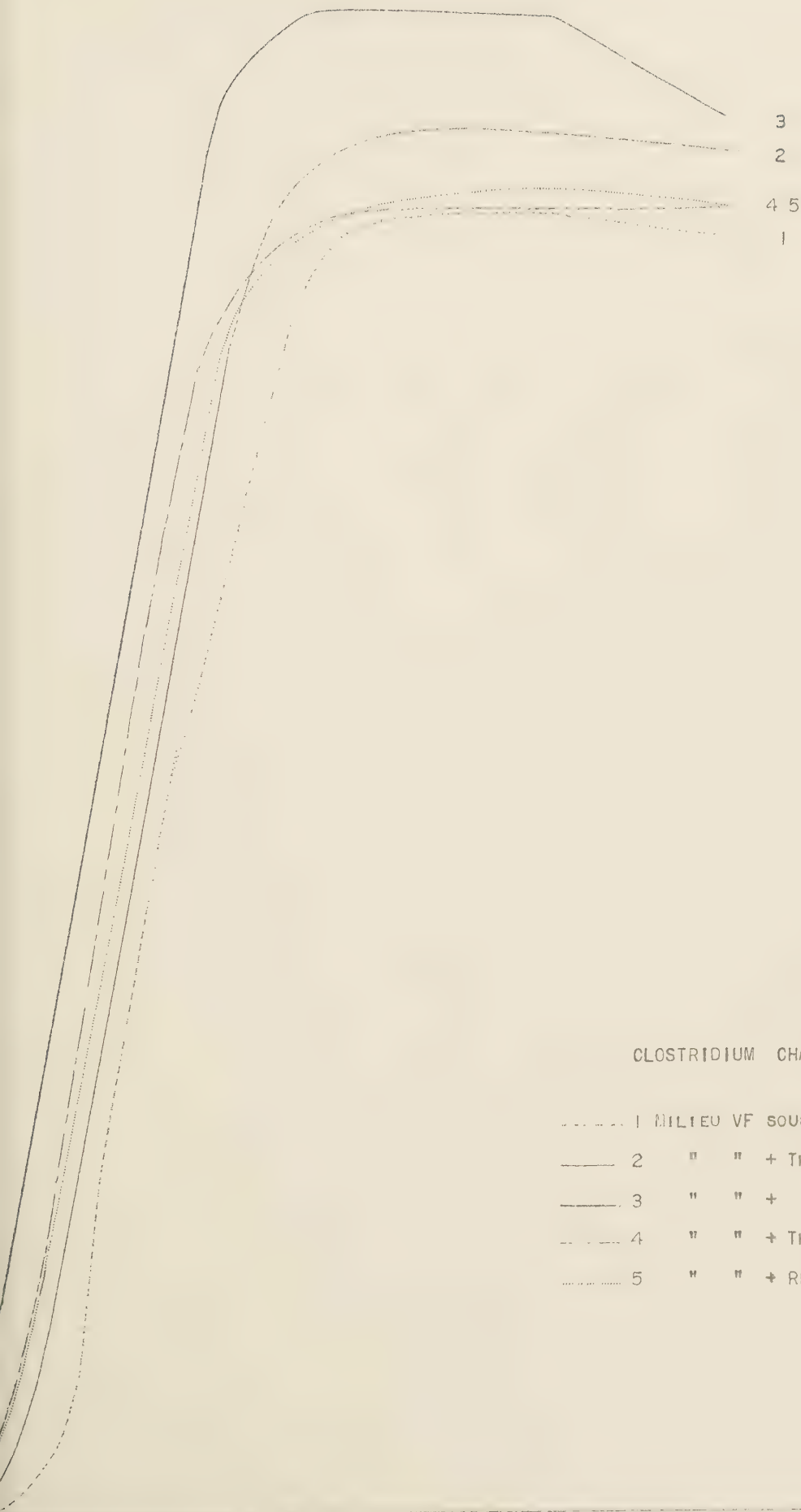
Nous avons rencontré les même difficultés avec notre souche de Pl. tetani qui ne se développe rapidement que sur ces deux mêmes milieux.

CONCLUSION.

Au total, le thiomalate apparait comme un facteur d'anaérobiose très favorable. Non inhibiteur à dose relativement élevée, il est possible d'en augmenter les concentrations : le développement microbien est alors plus intense et il est permis de se demander si cette action accélératrice ne correspond pas à l'utilisation du produit par les bactéries aussi bien qu'à ses propriétés réductrices.

Mais les moyens dont nous disposions ne nous ont pas permis d'étudier le métabolisme des anaérobies comme nous l'avions fait pour quelques germes aérobies. Les anaérobies en effet alcalinisent les milieux de culture et il n'est pas possible de suivre les processus fermentaires par l'étude des variations du pH.





CLOSTRIDIUM CHAUVEI

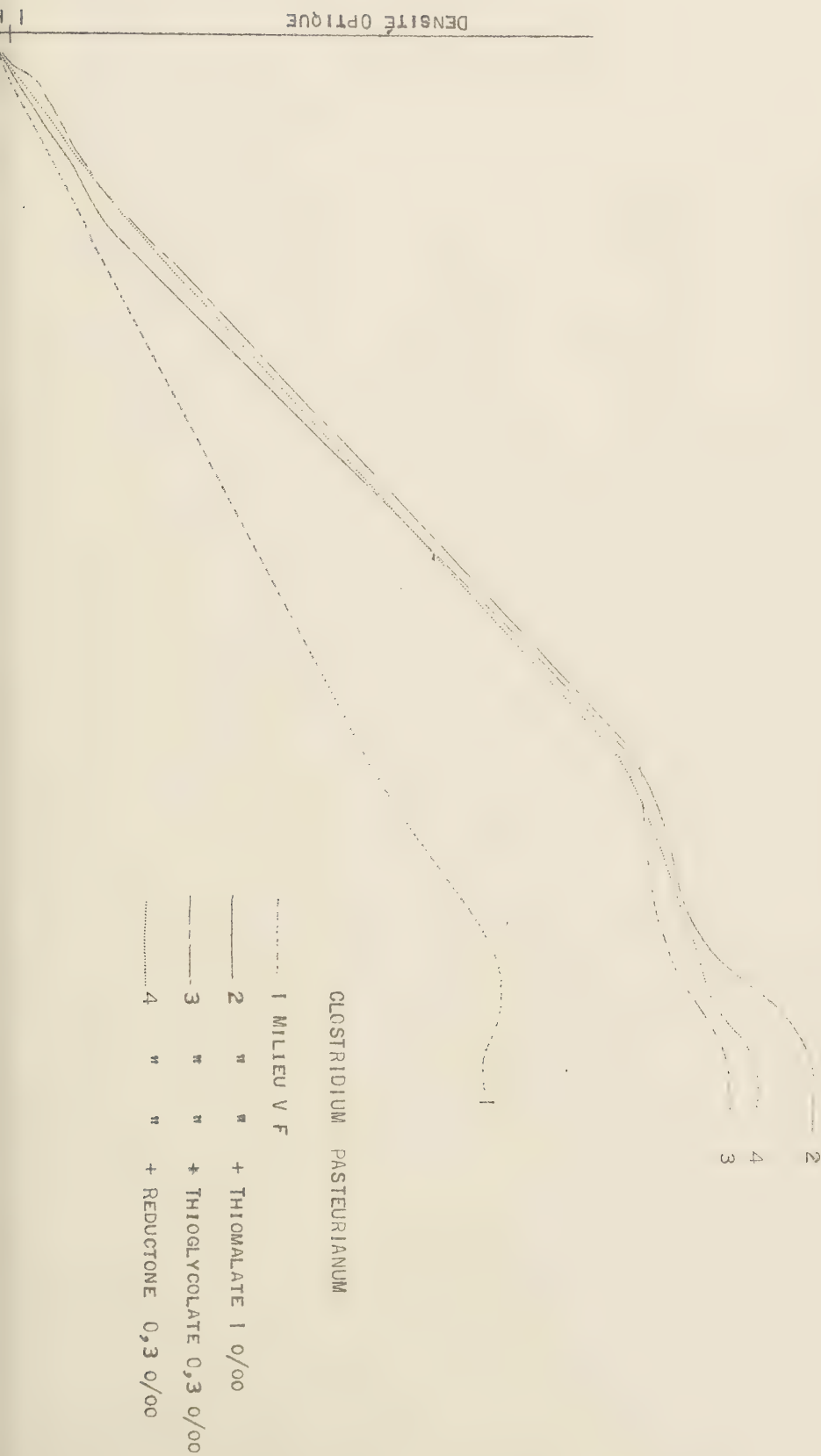
..... 1 MILIEU VF SOUS HUILE

——— 2 " " + THIOMALATE 0,3 0/00

----- 3 " " + " 1 0/00

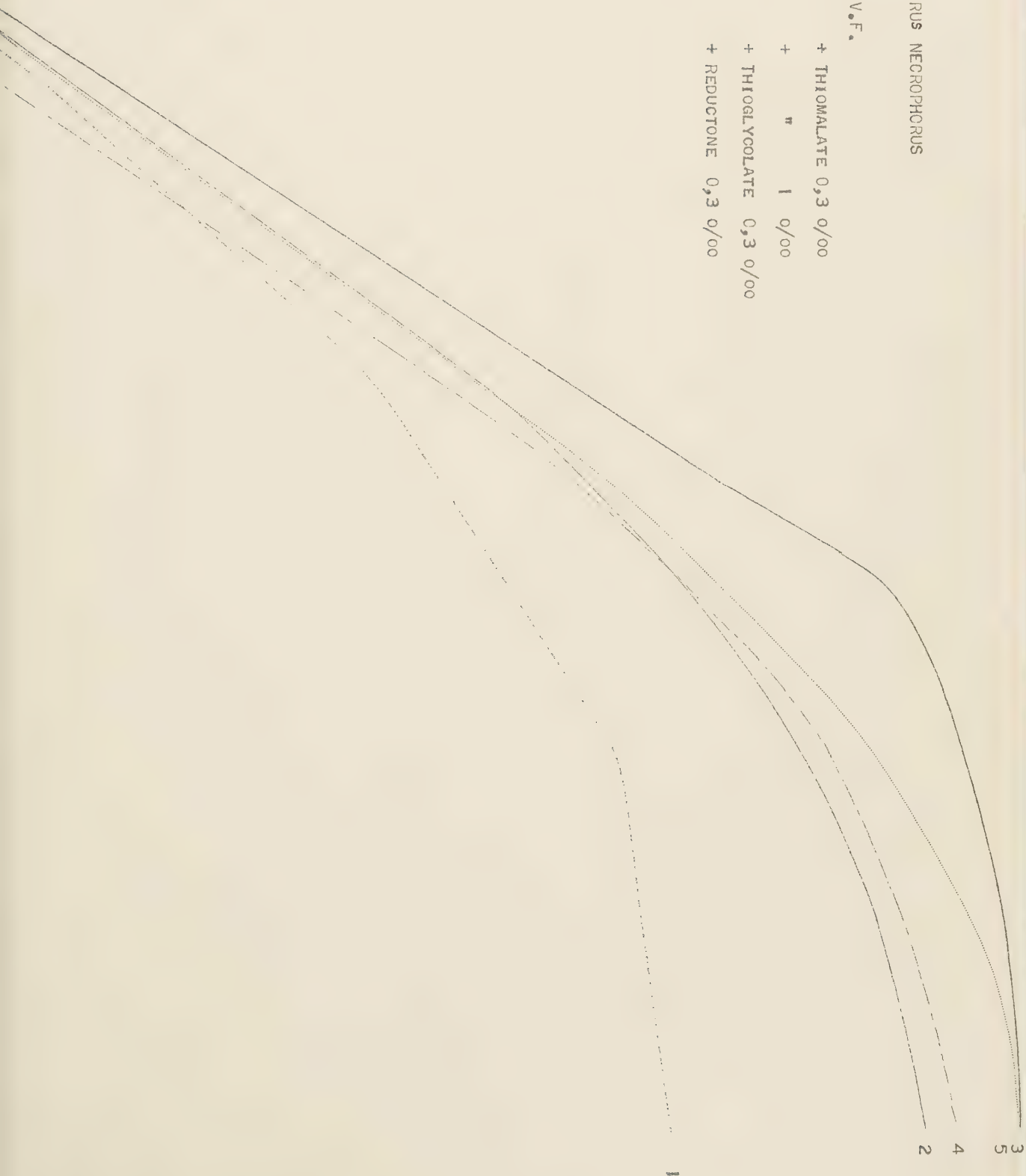
- . - . - 4 " " + THIOGLYCOLATE 0,3 0/00

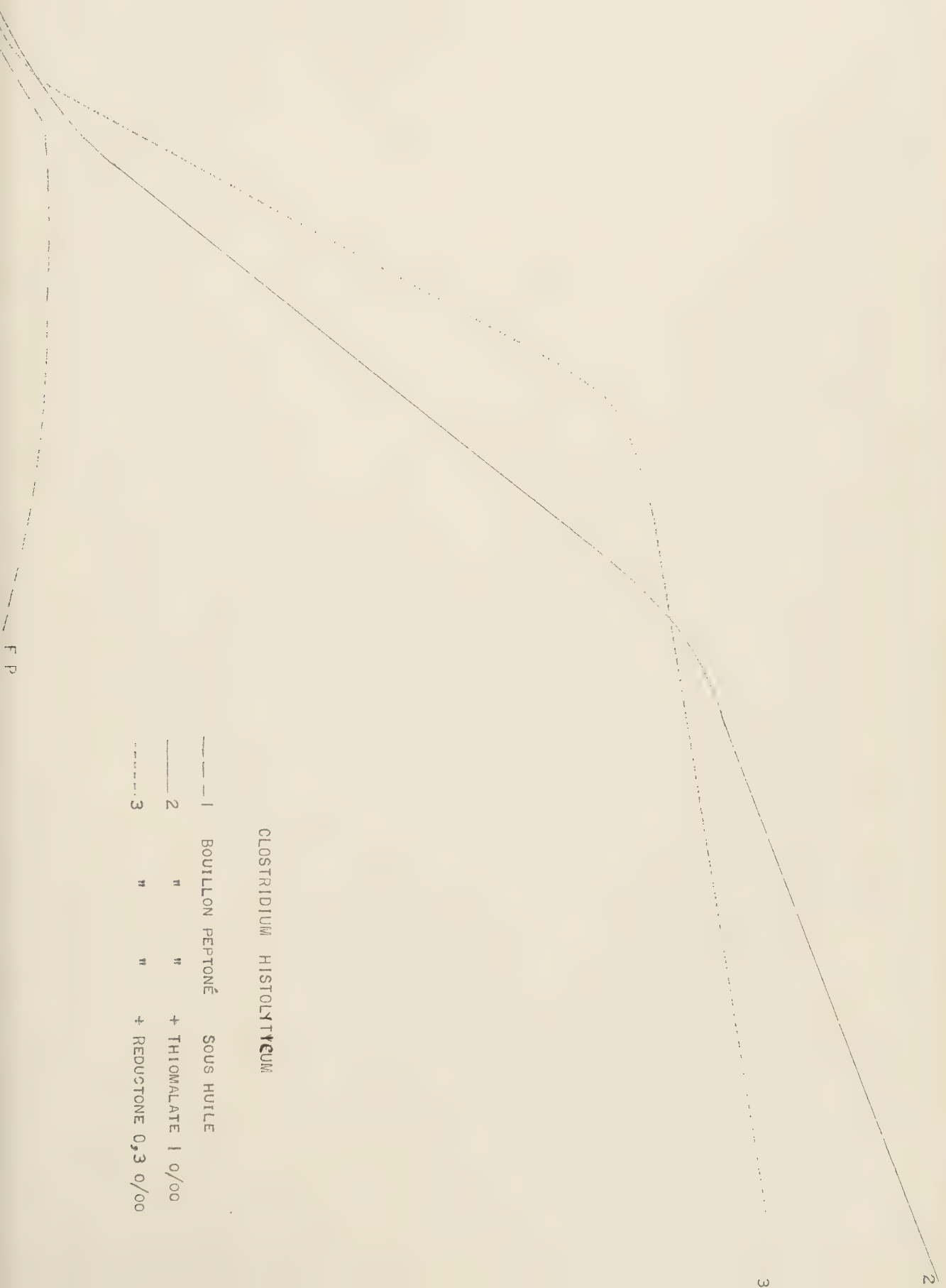
----- 5 " " + REDUCTONE 0,0 0/00



SPHEROPHORUS NECROPHORUS

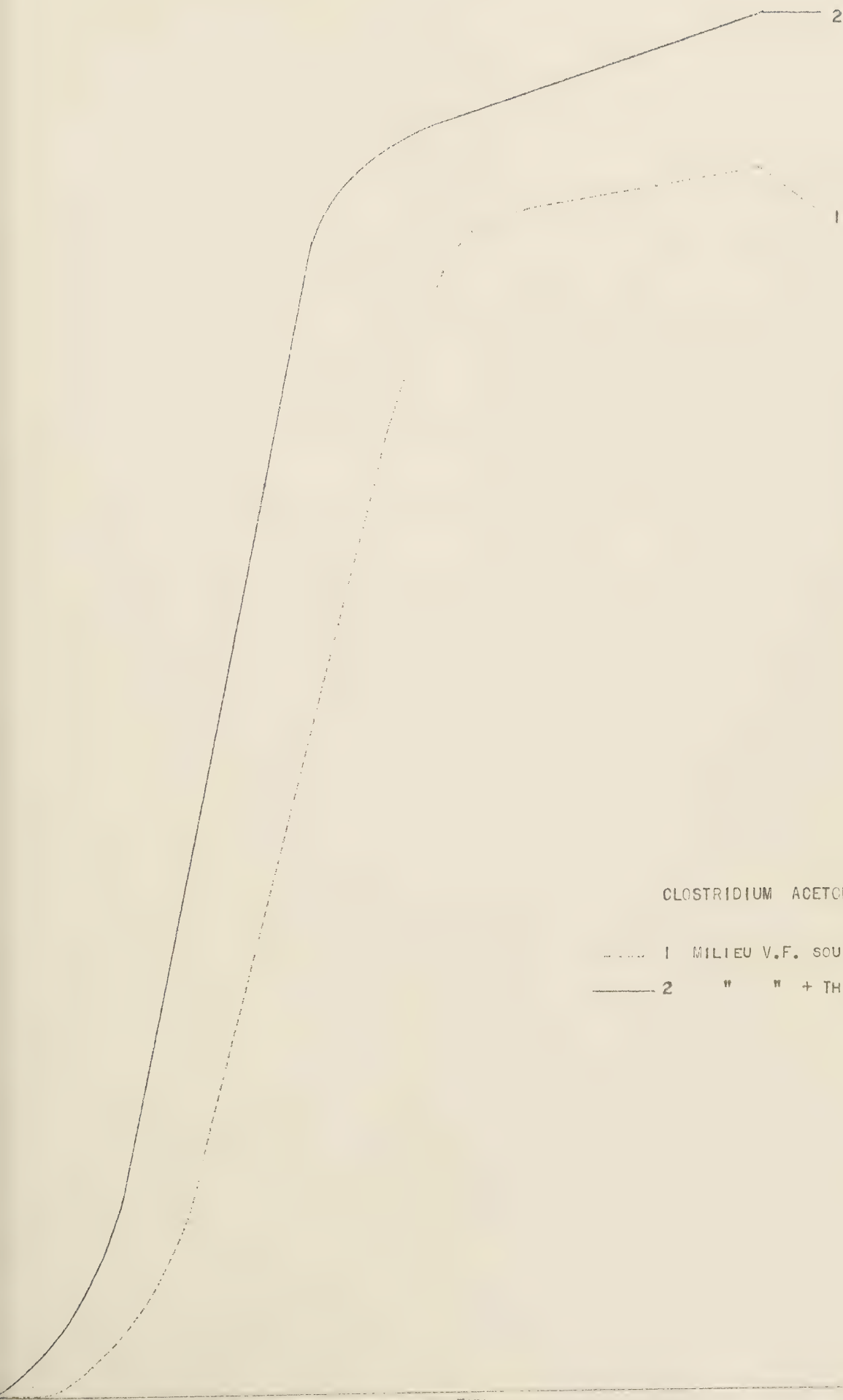
1	BOUILLON V.F.	
2	"	+ THIOALATE 0,3 0/00
3	"	+ " 1 0/00
4	"	+ THIOGLYCOLATE 0,3 0/00
5	"	+ REDUCTONE 0,3 0/00





CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM

- 1 BOUILLON PEPTONÉ SOUS HUILE
- 2 " " + THIOMALATE 1 g/100
- 3 " " + REDUCTONE 0,3 g/100



CLOSTRIDIUM ACETOBUTILICUM

— 1 MILIEU V.F. SOUS HUILE
— 2 " " + THIOALATE 1 0/00

T I T R E I I

THIOMALATE DE SODIUM ET ANTIBIOTIQUES

Nous avons vu que la neutralisation de l'action bactéricide des sels de mercure, de bismuth et d'arsenic par les thiols était due à une combinaison directe entre les groupes -SH et l'ion toxique (EAGLE -31-, FILDES -33c-, NORDMANN et ses collaborateurs -62-). De nombreux travaux ont montré que cette inactivation par les dérivés sulfhydrilés du pouvoir antibactérien s'étendait aux sulfamides et aux antibiotiques (COMES -25-). Le mécanisme de cette inhibition peut correspondre à un phénomène de compétition analogue à celui qui se produit dans l'antagonisme entre l'acide para-aminobenzoïque et les sulfamides (HAMMET -43- a montré en effet que le groupe -SH est essentiel à la prolifération cellulaire) ou à une combinaison directe entre l'antibiotique et le dérivé sulfhydrilé.

L'action de la cystéine sur la pénicilline et la streptomycine correspondrait à cette deuxième hypothèse selon SIMON (83). Dans le cas de la pénicilline la combinaison serait suivie d'une dégradation de la molécule antibiotique, libérant des composés capables de déclencher une réaction en chaîne en se combinant aux molécules intactes. En ce qui concerne la streptomycine, la fixation des fonctions -SH donnerait lieu à la formation d'un complexe soumis à une réaction d'équilibre : il y a en effet une relation constante entre les doses de streptomycine et les quantités de cystéine nécessaires pour l'inhiber.

De semblables réactions se produiraient in vivo, et pour CATTANAO (18), étudiant les causes d'échec du traitement par la streptomycine, les principaux inhibiteurs seraient représentés par les groupes -SH issus de la désintégration des protéines tissulaires et acides nucléiques, susceptibles de se fixer sur le groupe guanidine du médicament.

Tous les dérivés sulfhydrilés n'ont cependant pas la même activité CAVALLITO et BAILEY (19) testant différents composés par la méthode des "cup" en gélose, en présence de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella paratyphi* A, constatent que si le chlorhydrate de cystéine est un inhibiteur actif, le glutathion et l'acide thioglycolique n'ont par contre qu'un effet minime ou nul, sur divers antibiotiques.

Par ailleurs, GREEN (38) met en évidence que les sels de l'acide malique sont antagonistes vis-à-vis de la streptomycine.

EXPERIENCES EN MILIEUX LIQUIDES.

Nous avons repris ces expériences avec le thiomalate de sodium selon la méthode des dilutions en bouillon.

En présence de thiomalate à deux concentrations différentes nous avons vérifié l'activité des antibiotiques les plus utilisés en clinique : pénicilline, streptomycine, dihydrostreptomycine, chloromycétine, terramycine, auréomicine, sur la culture de trois souches microbiennes : *Streptococcus faecalis*, *Salmonella paratyphi* B et *Staphylococcus Heatley*.

Au préalable, immédiatement avant l'expérience, nous avons déterminé la résistance de chacune des souches au thiomalate. Celle-ci se situa à 0,012 gramme par cm³ pour l'enterocoque, 0,03 pour la salmonella, et 0,06 pour le staphylocoque. Les concentrations utilisées, 0,0005 et 0,002 gramme/centimètre cube, bien inférieures aux doses toxiques, laissent une marge de sécurité importante.

Pour chaque germe, une gamme ne contient pas de thiomalate et sert de témoin. Les tubes sont ensemencés à l'aide d'une quantité égale de solution au millième d'une culture de 24 heures sur bouillon.

Après 18 heures d'étuve à 37° on apprécie les résultats par lecture turbidimétrique.

Ceux-ci, réunis dans le tableau N° IV, sont exprimés en unités pour la pénicilline et en gammas pour les autres antibiotiques.

Vis-à-vis de la pénicilline seule la sensibilité de *Streptococcus faecalis* est diminuée en présence de thiomalate de sodium.

Le thiomalate diminue considérablement la sensibilité des trois souches vis-à-vis de la streptomycine. Cette inhibition croît lorsqu'on élève la concentration en thiomalate en présence du bacille paratyphique et de staphylocoque Heatley.

Même inactivation de la dihydrostreptomycine en présence de ces deux derniers germes.

L'activité de la chloromycétine, terramycine, auréomycine, n'est pas influencée par la présence de thiomalate de sodium dans les cultures des micro-organismes étudiés.

T A B L E A U I V

STREPTOCOCCUS FAECALIS						
	PENICIL- LINE	STREPTO- MYCINE	DIHYDRO STREPTOMYCINE	CHLOROMY- CETINE	TERRAMY- CINE	AUREOMY- CINE
BOUILLON ORDINAIRE	0,75	150	300	15	3,5	0,75
B.O. + THIOMALATE 0,5 %.	3,5	300	300	15	3,5	0,75
B.O. + THIOMALATE 2 %.	3,5	300	300	15	3,5	0,75
SALMONELLA PARATYPHI B						
BOUILLON ORDINAIRE	75	300	300	7,5	3,5	3,5
B.O. + THIOMALATE 0,5 %.	75	600	600	7,5	3,5	3,5
B.O. + THIOMALATE 2 %.	75	1.200	600	7,5	3,5	3,5
STAPHYLOCOCCUS HEATLEY						
BOUILLON ORDINAIRE	0,03	15	15	15	0,30	0,30
B.O. + THIOMALATE 0,5 %.	0,03	30	30	15	0,30	0,30
B.O. + THIOMALATE 2 %.	0,03	75	75	15	0,30	0,30

RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MÉTHODE DES DILUTIONS EN BOUILLON.

EXPERIENCES EN MILIEUX SOLIDES.

Dans une seconde série d'expériences nous avons cherché si cette inhibition était appréciable sur milieu solide.

Le thiomalate en solution aqueuse est incorporé à la gélose fondue (gélose à 30 pour mille) aux concentrations utilisées précédemment, soit 0,5 et 2 pour mille.

On ensemence avec une culture de 24 heures sur bouillon cette gélose refroidie mais encore liquide et on coule en boîtes de Pétri. La résistance est appréciée à l'aide de disques imprégnés d'antibiotiques que fournit l'Institut Pasteur. On mesure le diamètre de la zone d'inhibition qui entoure chaque disque après 24 heures d'étuve à 37°.

Pour chaque expérience nous avons préparé deux séries de boîtes; les premières étant ensemencées avec une culture diluée à un pour mille; les secondes avec une culture diluée à vingt pour mille. (Ceci afin de vérifier l'influence de la concentration microbienne.)

Les résultats, consignés dans le tableau n° V, sont beaucoup moins nets qu'en milieu liquide.

Dans ces expériences, l'action inhibitrice du thiomalate vis-à-vis de la pénicilline ne se manifeste en présence d'aucun germe.

La sensibilité à la streptomycine des germes est diminuée pour salmonella, inconstante pour les autres souches.

D'autres essais donnent de semblables résultats.

Les variations observées sont très proches de la limite d'erreur qu'il est possible de faire en mesurant le diamètre des disques d'inhibition.

CONCLUSION

Ainsi l'action inhibitrice du thiomalate de sodium vis-à-vis des antibiotiques n'apparaît comme réellement intéressante que dans le cas de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine.

Difficilement mise en évidence sur gélose par la méthode des disques, cette action se manifeste avec netteté en milieu liquide.

Les applications pratiques de cette propriété seront exposées aux chapitres consacrés à l'expérimentation clinique.

STREPTOCOCCUS FAECALIS

DILUTION DE LA CULTURE MICROBIENNE	PENICILLINE		STREPTOMYCINE		CHLOROMYCETINE		TETRACYCLINE		AUREOMYCINE	
	1 %	20 %	1 %	20 %	1 %	20 %	1 %	20 %	1 %	20 %
GÉLOSE ORDINAIRE	11	10	13	12	19	22	15	18	18	19
G.O. + THIOMALATE 0,5 %	11	10	13	12	19	22	15	19	15	19
G.O. + THIOMALATE 2 %	11	10	13	10	19	22	17	18	19	19

SALMONELLA PARATYPHI B

GÉLOSE ORDINAIRE	10	10	20	19	26	25	19	19	17	18
G.O. + THIOMALATE 0,5 %	10	10	16	17	26	25	19	19	17	17
G.O. + THIOMALATE 2 %	10	10	16	16	26	25	19	19	17	17

STAPHYLOCOCCUS HEATLEY

GÉLOSE ORDINAIRE	40	37	24	20	27	28	28	27	25	25
G.O. + THIOMALATE 0,5 %	40	37	24	20	27	28	28	27	25	24
G.O. + THIOMALATE 2 %	40	37	22	20	25	26	26	27	25	25

RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MÉTHODE DES DISQUES SUR GÉLOSE.
MESURES EN MILLIMÈTRES DU DIAMÈTRE DES ZONES D'INHIBITION.

T I T R E I I I

THIOMALATE DE SODIUM ET COAGULATION SANGUINE

Les composés sulfhydrilés possèdent une action anti-coagulante expliquée par la formation de composés d'addition avec les groupes -SH du fibrinogène. TUDORANU et ses collaborateurs (26) constatent que les sulfamides ont cette propriété. Les doses actives varient suivant le produit employé, de 0,025 gramme pour le Prontosil à 0,30 gramme pour l'Albucid en présence de 5 cm³ de sang.

Nous avons vérifié que le thiomalate de sodium est lui aussi un anti-coagulant actif vis-à-vis du sang humain.

Le sang prélevé par ponction veineuse rapide est immédiatement porté au B.M. à 37° dans un tube calibré contenant la quantité nécessaire de thiomalate; un témoin est préparé en même temps, en portant une même quantité de sang dans un tube de mêmes dimensions.

Pour une concentration de 4 g. de thiomalate par litre de sang, le temps de coagulation à 37° est allongé de 2 à 3 minutes.

La plupart des échantillons sont incoagulables en présence de 10 à 12 g. pour mille de thiomalate de sodium, mais on observe parfois des coagulations tardives après plusieurs heures. A ce moment les globules sont sédimentés et l'on assiste à la formation d'un caillot blanc à la partie supérieure du tube. (Tableau n° VI).

Dans les milieux thiomalatés destinés aux hémocultures, cette propriété assure une meilleure diffusion des germes. En effet, il est parfois difficile de dissocier les amas de fibrine qui se constituent dans les milieux usuels et où les bactéries restent emprisonnées.

TABLEAU VI

TEMOIN	SANG + THIOMALATE DE NA GR /1000 ^{CC}			
	4	8	12	15
4'		8'		
6'	7'		8'	
2'				
6'	8'	13'		
4'	7'	11'		
6'30"	8'30			
7'				
4'				
6'		60'		
5'				
7'30"	9'			
9'			>13 ^H	
7'		12'	17 ^H	
6'				
6'				
8'	11'			
6'30"			22 ^H	
7'	10'30"			

T I T R E I V

RESULTATS OBTENUS DANS LES LABORATOIRES HOSPITALIERS PAR

L'EMPLOI DE MILIEUX AU THIOMALATE DE SODIUM

Depuis deux années les milieux au thiomalate de sodium sont expérimentés au Laboratoire de la Clinique des Maladies Infectieuses et à l'Institut Bactériologique de Lyon (Service annexe de l'Hôpital Edouard Herriot et Service des Sérums).

Les statistiques faites dans ces laboratoires portent, d'une part sur l'isolement de germes à partir de sang, d'urine, de pus, de liquide pleural, de liquide céphalo-rachidien, et d'autre part sur les essais de stérilité des ampoules de sérum.

CHAPITRE I

MILIEUX UTILISES

Nous utilisons deux sortes de milieu systématiquement, l'un mixte aéro-anaérobie, l'autre strictement anaérobie.

A - Milieux Mixtes.

Nous avons tout d'abord utilisé le milieu habituellement employé pour les hémocultures, additionné de thiomalate de sodium :

Bouillon au placenta	1 litre
Glucose	5 grammes
Thiomalate de sodium	2 "

ajuster à pH 7,4. Stériliser.

Actuellement nous préconisons un milieu plus complexe, suffisamment riche pour satisfaire un nombre de germes important.

Milieu Aéro-Anaérobie (Th. 0,5).

Agar-agar lavé	0,20 gramme
Peptone pancréatique de caséine (Roche)	5 "
Maltose	1 "
Glucose	1 "
Chlorure de sodium	5 "
Phosphate monopotassique	1 "
Phosphate dipotassique	2 "
Thiomalate de sodium	0,5 "
Bouillon placenta q.s.p.	1 litre

Dans une partie du bouillon dissoudre les sels, les sucres et le thiomalate. Dans l'autre mettre en solution à chaud la gélose et la peptone. Mélanger les deux solutions. Vérifier le pH qui doit être de 7,4. Le milieu réparti en tubes (10 cm³ par tube) ou en flacons (120 cm³ par fiole à hémoculture de 180 cm³), est stérilisé à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes.

Ce milieu est riche en acides aminés grâce aux protéines placentaires et à l'hydrolysate de caséine. La quantité de sucre, très suffisante, a été limitée pour éviter les phénomènes d'inhibition vis-à-vis des germes aérobies particulièrement sensibles à la présence de sucres ou de leurs produits de décomposition apparus au cours de la stérilisation.

La présence d'un système tampon phosphaté assure la constance du pH et en fait un bon milieu de conservation.

La présence de gélose réalise une consistance particulièrement favorable au départ de certaines bactéries.

Le thiomalate qui permet la croissance des germes anaérobies et, à cette dose, n'inhibe pas les aérobies en fait un milieu mixte. De plus grâce à ses propriétés anti-coagulantes il favorise la dispersion des germes dans le milieu. En respectant la proportion de 10 à 20 cm³ de sang humain pour 120 cm³ de milieu nous n'avons jamais observé de coagulation. Enfin, grâce encore au thiomalate, ce milieu inhibe la streptomycine, dans les liquides biologiques prélevés chez les malades en traitement.

L'adjonction d'une ampoule de pénicillinase et d'une ampoule de un cm³ d'acide paraminobenzoïque à 1 pour mille par fiole à hémoculture en fait un milieu anti-streptomycine, anti-pénicilline et anti-sulfamide.

B - Milieu Anaérobie Strict (Th2)

Agar-agar.....	0,5	gramme
Peptone pancréatique de caséine Roche.....	10	"
Maltose	5	"
Chlorure de sodium.....	5	"
Phosphate monopotassique.....	1	"
Phosphate dipotassique	2	"
Thiomalate de sodium.....	2	"
Bouillon placenta q.s.p.....	1	litre

Préparé selon la même technique que le précédent (Th. 0,5) ce milieu ajusté à pH 7,4 est réparti en tubes longs de 8 à 9 mm. de diamètre ou en flacons pour hémoculture recouverts d'huile de vaseline et stérilisé à 110°, durant 20 minutes.

Il est plus riche que Th. 0,5 ou Th. 1 en peptone et en sucre. Nous avons choisi le maltose plus favorable aux anaérobies. Il présente les mêmes avantages au point de vue pouvoir tampon, anti-coagulant et anti-streptomycine.

La forte quantité de thiomalate et l'huile de vaseline assurent une anaérobiose stricte.

L'addition de bleu de méthylène (leucodérivé) montre qu'il n'y a pas d'oxydation en tubes bouchés au coton pendant au moins trente jours. Passé ce délai, le réactif commence à bleuir. Il est donc inutile de régénérer ce milieu quand la préparation remonte à moins d'un mois.

CHAPITRE II

UTILISATION DES MILIEUX AU THIOMALATE DANS LA PRATIQUE DES HEMOCULTURES

A - Essais comparatifs.

Dans le cours de l'année 1951 les hémocultures de la Clinique des Maladies Infectieuses ont été pratiquées systématiquement sur trois milieux :

- bouillon au placenta glucosé (B.G.)
- bouillon au placenta glucosé sous huile (B.G. h.)
- bouillon au placenta glucosé thiomalaté (B.G. Th.) à 2 pour mille premier milieu décrit dans le paragraphe précédent.

En outre, nous avons une fois employé ce dernier bouillon sous huile, comme nous le verrons ultérieurement.

Comme il s'agit d'examens pratiqués dans un but clinique, où la rapidité d'exécution présente un grand intérêt, nous n'avons considéré comme positives, parmi les diverses cultures mises en route, que celles qui les premières ou simultanément donnaient lieu à une pousse microbienne, ne retenant pas les cultures qui, encore négatives à ce moment-là, auraient pu néanmoins engendrer un développement bactérien ultérieur.

Le tableau VII résume les résultats obtenus.

On voit dans cette première étude que les milieux au thiomalate n'apparaissent satisfaisants que pour les streptocoques et les staphylocoques. Par contre les entérobactéries s'y développent difficilement : 75 % de bacilles d'Eberth et 72 % de para typhiques seulement y sont retrouvés.

S'agit-il dans quelques cas d'ensemencement insuffisant ? Il est parfois difficile d'obtenir les trente ou quarante centimètres cube de sang nécessaires à ces examens en série; il est évident, que le milieu d'essai, ensemencé en dernier, par prudence, est alors défavorisé.

S'agit-il dans d'autres cas, d'un excès de thiomalate, inhibiteur in vivo ? Nous y avons remédié par la suite en diminuant les doses dans le milieu Th. 0,5.

Notons que dans un cas où les trois ensemencements habituels étaient négatifs après plusieurs essais, le malade étant toujours fébrile nous avons utilisé un bouillon thiomalaté sous huile. Nous avons ainsi pu isoler en 48 heures un Staphylocoque anaérobie.

T A B L E A U V I I

HEMOCULTURES CLINIQUE MALADIES INFECTIEUSES

	STAPHYLOCOQUES	STREPTOCOQUES HEMOLITIQUES ET VIRIDANS	STAPHYLOCOQUES ANAEROBIES	MENINGOCOQUES	BRUCELLA	SALMONELLA TYPHI	SALMONELLA PARA B	COLIFORMES	SUBTILIS
NOMBRE DE CULTURES POSITIVES SUR 3 MILIEUX	6	5	0		1	9	13		1
BOUILLON-GLUCOSÉ	7	5	0	2	1	11	17	1	1
BOUILLON GLUCOSE SOUS HUILE	9	5	0	0	1	12	16		1
BOUILLON GLUCOSE + THIAMALATE 2 %	8	6	0	NON UTILISÉ	2	9	13		1
BOUILLON GLUCOSÉ + THIAMALATE SOUS HUILE			1						
TOTAL	9	6	1	2	12	18	1	1	1

B - Statistique effectuée à l'Hôpital Edouard Herriot.

Ces premiers essais et les résultats obtenus avec des souches isolées de bactéries aérobies et anaérobies nous ont amenés à utiliser des milieux plus riches.

A l'annexe de l'Institut Bactériologique, l'utilisation durant quelques mois des milieux Th. 0,5 et Th2 précédemment décrits ayant donné des résultats intéressants, ces deux milieux furent définitivement adoptés. Les résultats exprimés dans le tableau VIII portent sur l'ensemble des hémocultures effectuées en 1952.

Les examens, demandés le plus souvent par des services de médecine générale, ont permis d'isoler des germes beaucoup plus variés que précédemment.

Les cocci à Gram positif : staphylocoques, streptocoques, enterocoques, le plus couramment rencontrés, s'isolent facilement sur nos milieux en donnant naissance à une culture rapidement abondante.

Les bacilles à gram négatif sont peu fréquents, sauf E. coli. Les cas de salmonelloses mis en évidence étaient généralement ingorés et aussitôt dirigés sur le service des infectieux.

Nous groupons ensemble un certain nombre de bactéries : staphylocoques blancs ne donnant pas de test de pathogénicité positif, Faecalis alcaligènes, B. subtilis, flavobactéries, qui en l'absence de données cliniques précises représentaient sans doute des germes de bactériemies ou de contamination. Dans plusieurs cas des examens répétés ont montré qu'il ne s'agissait pas de contaminations accidentelles.

Aucun anaérobie strict ne figure dans cette statistique. Les septicémies qu'ils déterminent sont exceptionnelles à l'heure actuelle. Les germes isolés sur milieu Th2 sont des anaérobies facultatifs. On a depuis longtemps constaté d'ailleurs qu'à partir des liquides biologiques de tels germes s'isolent plus facilement en anaérobiose.

Si nous comparons cette statistique avec les résultats obtenus antérieurement dans ce même laboratoire où les hémocultures étaient pratiquées sur bouillon peptoné ou bouillon peptoné sous huile, nous constatons la présence d'un plus grand nombre d'hémocultures positives à staphylocoques et à streptocoques. Nous constatons également l'isolement plus fréquent de germes de bactériemies transitoires, dont la mise en évidence était exceptionnelle avant l'emploi des milieux au thiomalate.

T A B L E A U V I I I

HEMOCULTURES HOPITAL Ed. HERRIOT 1954										
	HÉMOCULTURES ENSEMENCÉES	HÉMOCULTURES POSITIVES	STAPHYLOCOCCUS VIRANT LE MANNITOL	STREPTOCOCCUS HÉMOLYTIQUE ET VIRIDANS	STREPTOCOCCUS FAECALIS	DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE	SALMONELLA PARATYPHI B	ESCHERICHIA COLI	KLEBSIELLA	BACTÉRIES DIVERSES ET CONTAMINATIONS
MILIEU TH 0,5	946	178	83	15	15	1	6	15	2	41
MILIEU TH 2	393	69	32	5	5	0	5	6	3	13

CHAPITRE III

UTILISATION DE MILIEUX AU THIOMALATE AU COURS DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DE PRODUITS BIOLOGIQUES NORMAUX OU PATHOLOGIQUES

Outre les hémocultures, l'annexe de l'Institut Bactériologique à l'Hôpital Ed. Herriot, examine des laits, liquides céphalorachidiens, liquides pleuraux, pus. Depuis quelques mois les milieux Th. 0,5 et Th. 2 ont été incorporés à la galerie systématique d'ensemencement, de sorte que celle-ci comprend les milieux suivants :

- 1 tube d'eau peptonée.
- 1 tube de bouillon ordinaire.
- 1 tube de bouillon glucosé.
- 1 tube de milieu Th. 0,5.
- 1 tube de milieu Th. 2
- 3 tubes de milieu V.F.
- 1 tube de milieu à l'azoture de Hajna-Perry.
- 1 plaque de gélose mannitée de Chapman.
- 1 plaque de gélose au sang frais de cheval.
- 1 plaque de gélose lactosée au bromocrésol pourpre.

Dans tous les cas où un développement microbien a lieu en eau peptonée, en bouillon ordinaire, en bouillon glucosé, il se retrouve sur Th 0,5, plus inconstant sur Th. 2.

Dans tous les cas où les milieux de Hajna-Perry et de Chapman donnent lieu à une culture, on la retrouve également sur Th. 0,5 et parfois sur Th. 2.

Le milieu Th. 0,5 donne les résultats le plus fréquemment positif.

Dans quelques cas particuliers Th. 0,5 et Th. 2 se sont révélés les seuls milieux d'isolement possible. Nous en rapportons les exemples les plus caractéristiques.

Observation N° 1.- Enfant Tr.

Signes méningés. Etude du L.C.R. :

1^{ère} ponction, 1^{er} jour : dans le culot de centrifugation présence de bacilles à gram négatif en grande abondance. Cultures positives sur : E.P., B.O., B.G., Th 0,5, Th 2, gélose lactosée au bromocrésol pourpre en 24 heures.

Identification : *Klebsiella pneumoniae*. Traitement : streptomycine.

2ème ponction, 2ème jour : présence de *Klebsiella* dans le culot de centrifugation.

Cultures positives sur E.P., B.O., B.G., Th 0,5, Th 2, gélose lactosée au bromocrésol pourpre, en 24 heures.

3ème ponction, 4ème jour : absence de bacilles à l'examen direct du culot.

Après 24 heures, cultures sur E.P., B.O., B.G., et gélose lactosée au bromocrésol pourpre : négatives.

Cultures sur Th 0,5 et Th 2 : positives.

On continue le traitement.

4ème ponction, 5ème jour : l'examen direct du culot de centrifugation est négatif. Après 24 heures :

Cultures sur E.P., B.O., B.G., et gélose lactosée au bromocrésol pourpre : négatives.

Cultures sur Th 0,5 et Th 2 : positives.

L'enfant reçoit toujours de la streptomycine.

5ème ponction : l'examen direct du culot de centrifugation est négatif. Toutes les cultures sont alors négatives.

A partir de ce jour les examens bactériologiques du L.C.R. sont tous négatifs (examen direct et cultures). La formule cytologique s'améliore progressivement.

Il semble, dans ce cas, que les propriétés anti-streptomycine des milieux Th 0,5 et Th 2 aient permis le développement du microbe malgré le traitement, alors qu'il était impossible de l'isoler par repiquage sur les milieux ordinaires.

Observation N° 2.- Malade R.

Pus appendiculaire.

Il s'agit d'un pus fétide révélant à l'examen direct la présence de germes polymorphes à Gram négatif. On ensemence sur la galerie complète.

Après 24 heures culture positive sur Th 2 seul (milieu anaérobie strict sous huile). Il s'agit d'un germe à Gram négatif polymorphe. Après 48 heures la végétation est plus abondante, mais les autres milieux restent stériles, même la gélose V.F.

La culture repiquée sur Th 2 et V.F. montre, après 24 heures, une pousse abondante sur Th 2, très faible sur V.F.

L'identification montre qu'il s'agit de *Spherophorus necroticus*.

En première génération le milieu Th 2 s'est montré comme le seul capable de permettre l'isolement de ce germe, se révélant ainsi supérieur au milieu V.F.

Observation N° 3.- Malade G.

Urines. Le malade est en cours de traitement par la streptomycine. Les urines fraîches prélevées aseptiquement sont ensemencées sur chacun des milieux de la galerie type.

Les cultures de 24 heures ne sont positives que sur Th 0,5 et Th 2.
Identification : *E. coli*.

Dans ce cas encore, il semble que soit intervenu le rôle anti-streptomycine du thiomalate de sodium.

Observation N° 4.- Malade P.

Hémoculture. L'hémoculture est négative en milieu aéro-anaérobie au 4ème jour. Le repiquage sur la galerie reste stérile. Après 10 jours d'étuve à 37°, le liquide surnageant est toujours clair dans le flacon original. Avant l'élimination définitive de l'hémoculture on la repique sur une galerie complète. En 48 heures sur milieux Th 0,5 et Th 2 apparaissent des cocci en chaînettes à Gram positif. Les autres milieux restent stériles.

L'identification montre qu'il s'agit de *Streptococcus viridans*.

Observation N° 5.- Lait N° A 10.

Lait de femme provenant du lactarium. Ce lait, ensemencé sur une galerie complète, donne une culture positive sur Th 0,5 et Th 2. Les autres milieux demeurent stériles.

Identification : *Streptococcus faecalis*.

CHAPITRE IV

VERIFICATION DE LA STERILITE DES AMPOULES DE SERUM

Le Service des Sérums de l'Institut Bactériologique de Lyon, pratique des essais de stérilité pour les ampoules qu'il fabrique : ampoules buvables de sérum de cheval, ampoules injectables de sérum anti-diphtérique et de sérum anti-tétanique.

Depuis un an l'emploi systématique des milieux Th 0,5 et Th 2 a été introduit comparativement à l'emploi de la gélose ordinaire et d'un milieu identique à Th 0,5, mais sans thiomalate.

La galerie d'ensemencement est donc constituée de :

- Milieu aéro-anaérobie Th 0,5; réparti en tubes à essai à raison de 15 cm³ par tube.
- Milieu anaérobie Th 2; réparti en tubes à essai à raison de 15 cm³ par tube, recouverts de 2 cm³ d'huile de vaseline.
- Milieu Th 0 : milieu de même formule que Th 0,5 mais sans thiomate.
- Gélose ordinaire : G.O., en tubes inclinés.

Le mode opératoire suivi est le suivant : une ampoule prélevée en cours de fabrication est ensemencée à parties égales sur chaque milieu. La culture est suivie pendant 10 jours à l'étuve à 37°.

Il a été ainsi procédé à 451 vérifications de stérilité d'ampoules dont les résultats sont consignés dans le tableau IX.

Ainsi 68 cultures sont positives sur les 4 milieux.

Une seule fois la gélose ordinaire a permis de mettre en évidence un germe qui ne se développait pas sur Th 0.

Par contre, dans 18 cas (17 par rapport à G.O.), les milieux thiomalates ont permis de mettre en évidence une contamination insoupçonnée par l'emploi des seuls milieux sans thiomalate.

Les germes les plus fréquemment rencontrés sont : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus faecalis* (ce dernier germe dans trois cas).

Dans les 18 résultats supplémentaires positifs sur Th 0,5 et les 14 sur Th 2, on retrouve surtout *B. subtilis* et *Pseudomonas*.

L'emploi de ces milieux thiomalatés dans la vérification de stérilité des ampoules, se trouve donc justifié par le fait qu'ils permettent d'éliminer des lots contaminés que les autres milieux faisaient accepter comme stériles.

T A B L E A U I X

— ESSAIS DE STÉRILITÉ DES AMPOULES —

MILIEUX UTILISÉS	TH 0,5	TH 2	TH 0	G.O.
TOTAL D'AMPOULES VÉRIFIÉES	451	451	451	451
NOMBRE DE CULTURES POSITIVES SUR LES 4 MILIEUX	68	68	68	68
NOMBRE DE CULTURES POSITIVES SUR UN MILIEU PARTICULIER	18	14		1
TOTAL DE CULTURES POSITIVES	86	82	68	69

C O N C L U S I O N S

Utilisé en bactériologie depuis 1949 le thiomalate de sodium introduit dans les milieux de culture liquides ou solides à des taux variant de 0,25 à 5 pour mille nous a constamment permis d'obtenir des cultures satisfaisantes des germes aérobies et anaérobies.

Il se révèle peu toxique pour les germes aérobies qu'il n'inhibe qu'à des concentrations variables suivant les souches étudiées, voisines de 10 pour mille en ce qui concerne les plus sensibles.

La courbe de croissance de ces germes n'est généralement pas altérée en présence de thiomalate de sodium à faible concentration. Par contre une action nettement favorable est mise en évidence vis-à-vis des bactéries des groupes streptocoques et staphylocoques. Les mêmes expériences répétées en présence de thioglycolate de sodium et de réductone nous ont donné des résultats inconstants.

Les milieux au thiomalate nous ont permis de conserver des souches de pneumocoques et de streptocoques vivantes pendant plusieurs mois sans repiquage.

Introduit dans les milieux couramment utilisés pour la culture des micro-organismes aérobies, le thiomalate de sodium permet sans précautions spéciales d'y faire croître les germes anaérobies stricts en tubes ordinaires bouchés au coton. Aux concentrations de 0,5 à 15 pour mille toutes nos souches ont donné lieu à des cultures appréciables.

Nous avons vérifié les propriétés anti-coagulantes du thiomalate de sodium vis-à-vis du sang humain.

Nous avons constaté son action inhibitrice de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine. Nous n'avons pas retrouvé cette propriété de façon constante en ce qui concerne la pénicilline et les autres antibiotiques testés : chloromycétine, auréomycine, terramycine ne sont pas influencés.

Ces constatations nous ont incité à préconiser un milieu mixte aéro-anaérobie contenant 0,50 gramme de thiomalate de sodium par litre.

Expérimenté systématiquement au cours de l'isolement des germes (contrôles de stérilité, cultures de liquides biologiques) grâce, dans certains cas, à ses propriétés anti-coagulantes et anti-streptomycines, ce milieu s'est montré particulièrement favorable.

Vu s

Le Doyen,
H. HERMANN

Le Président de la Thèse,
M. SEDALLIAN

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 13 Juin 1953

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
A. ALLIX

B I B L I O G R A P H I E

1. ACHALME.
Recherches bactériologiques sur le rhumatisme articulaire aigu.
Ann. Inst. Pasteur 1897 - 9 - p.184
2. ALESSANDRO, COMES
Bacteriostatic activity of some thio compounds
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1947 - 23 - p.1092
3. ALMY P.
A method for estimation of hydrogen sulfide in proteineous food products
Amer. Chem. Soc. 1925 - 47 - p.1381.
4. ANDERSEN P.
Apparatus for anaerobic cultivation.
Acta Path. of Microb. Scand. 1946 - 23 - p.158
5. ANDREASH
Synthèse de l'acide thiomalique
Bull. Soc. Chimique de Paris 1896 - 16 - p.505
6. AUBEL E., ROSENBERG, GRUNBERG.
Etude sur le potentiel d'oxydo-réduction limite de croissance des bactéries anaérobies.
Helvetica Chemica Acta 1946 - 29 - p.1267
7. AUBERTIN E., AUBEL E., GENEVOIS L.
Sur la culture aérobie des bactéries anaérobies.
C.R. Soc. Biol. 19 - 98 - p.957
8. BERTHELOT A.
Recherches sur l'acide pyruvique considéré comme facteur d'anaérobiose.
C.R. Acad. Sciences 1923 - 176 - p.1929
9. BIENSTOCK.
Anaérobiose et Symbiose.
Ann. Inst. Pasteur 1903 - 17 - p.850
10. BINET, WELLER.
Recherches sur le pouvoir antitoxique de composés sulfhydrilés.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1946 - 28 - p.751
11. BONNEL P.H.
Le contrôle bactériologique des produits biologiques au moyen d'un milieu permettant la culture à l'air libre des germes aérobies et anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur 1950 - 79 - p.422
12. BORDET J.
Une méthode de culture des microbes anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur 1903 - 18 - p.333
13. BREWER J.H.
Clear liquid medium for the "aérobie" cultivation of anaerobes
J.A.M.A. 1940 - 115 - p.598
Journ. of Bact. 1940 - 39 - p.6

14. BREWER J.H.
A new petri dish cover and technique for use in cultivation of anaerobes and microaerophiles.
Science 1942 - 95 - p.587
15. BREWER J.H.
The use of various reducing agents in a thioglycollate type medium
J. Bact. 1944 - 47 - p.456
16. British Pharmacopoeia 1948
Tests for sterility. p.829
17. CARRAZ M., MARRAL R., VAUZANGE B.G., ARCHINET M., DETOLLE P.
Utilisation du thiomalate de sodium en bactériologie.
Ann. Biol. Cl. 1950 - N°4 p.471
18. CATTANAO C.
Gli inibitori dell'attività antibatterica della streptomycina ed i loro rapporti con l'indicazione terapeutica del medicamento.
Lutta contra Tuberc. 1949 - 19 - p.420
19. CAVALLITO C.J., BAILEY J.H.
Preliminary note on the inactivation of antibiotics.
Science 1944 - 100 - p.390
20. CESARI E., ALLEAUX V.
Etude sur le bacille de Schmorl.
Ann. Inst. Pasteur 1912 - 26 - p.624
21. CHATARD H.
Le thiomalate de sodium nouveau détoxifiant.
Thèse Lyon 1948-1949.
22. CHAIX P., FLAMENS P.
Sur l'aptitude désulfurante de quelques micro-organismes homolactiques pourvus ou non de ferments hématiniques.
Biochimica et Biophysica Acta 1952 - 8 - p.38
23. CIARAUFI E.
Action of cysteine and other thio derivatives on respiration of Escherichia coli commune.
Boll. Ist. Sieroterap. Milan 1947 - 26 - p.59
24. Codex Français 1949
Penicillines (essais de stérilité) - p.547
25. COMES
The bacteriostatic activity in vitro of p. sulfanyltiophenol.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 1948 - 24 - p.651
26. DEBRAUD L.
Sur un nouveau procédé de culture du bacille du tétanos.
Ann. Inst. Pasteur 1900 - 14 - p.753
27. DELGA
Action du thiomalate de sodium dans les intoxications par certains arsenicaux.
Ann. Pharm. Franc. 1950 - 8 - p.181

28. DESNUELLE, FROMAGEOT Cl.
Décomposition anaérobie de la cystine par *Bacterium coli*.
Enzymologia 1939 - 6 - p.81
29. DUBOS R.
Observation on the oxidation-reduction properties of sterile bacteriological media.
J. Exp. Med. 1929 - 49 - p.507
30. DUBOS R.
The initiation of growth of certain facultative anaerobes as related of oxidation-reduction process in the medium.
J. Exp. Med. 1929 - 49 - p.559.
31. EAGLE H.
The effect of sulphydryl compounds on the antispirochetal action of arsenic, bismuth and mercury compounds in vitro.
J. of Pharmacology 1939 - 66 - p.437
32. FALEY K., SCHAUB I.
Importance of the use of thioglycollate medium in diagnostic bacteriology.
J. Bact. 1944 - 47 - p.455
- 33_a FILDES P., Mc INSTOSH J.
An improved form of Mc Instosh and Fildes anaerobic jar.
Brit. J. for Exp. Path. 1927 - 8 - p.387
- 33_b FILDES P.
The positive limit of oxidation-reduction potentiel.
Brit. J. for Exp. Path. 1929 - 10 - p.151
- 33_c FILDES P.
Inhibition of mercury salt.
Brit. J. for Exp. Path. 1940 - 21 - p.67
34. FOLPMESS, BEYERINCH.
Formation d'acide pyruvique à partir d'acide malique par les micro-organismes.
Proc. Ac. Sci. Amsterdam 1916 - 18 - p.1198
35. FRAENKEL.
Sur la culture des microbes anaérobies.
Zentralb. f. Bakt. 3 - p.735
36. FROMAGEOT C., MOMBAKER, DESNUELLE.
La désulfuration fermentaire de l'acide thiolactique.
Enzymologia 1938 - 2 - p.344
37. GOLDIE H.
Culture des microbes anaérobies à l'aide de produits leucocytaires et bactériens.
Ann. Inst. Pasteur 1932 - 48 - p.149
38. GREEN S.R., WAKSMAN S.A.
Effect of glucose, peptone, and saltz ou streptomycin activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 1948 - 67 - p.281

39. GREEN S.R., IVERSON W.P., WAKSMAN S.A.
Effect of organic acids on streptomycin activity.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 1948 - 67 - p.285
40. GRIMBERT.
Fermentation anaerobie produite par *B. orthobutylicus*.
Ann. Inst. Pasteur 1893 - 7 - p.353
41. GROSSAWICZ N., KAPLAN D.
Chemical sterilization of bacteriologic media by means of mercuri
oxycyanide and subsequent inactivation of mercurial by thioglycol-
late.
Science 1947 - 105 - p.237
42. GUILLEMARD A.
La culture des microbes anaérobies appliquée à l'analyse des eaux
Ann. Inst. Pasteur 1906 - 20 - p.155
43. HAMMET.
Chemical stimulus essential for growth by increase in cell number.
Proc. Am. Phil. Soc. 1929 - 68 - p.151
44. HITCHENS.
Advantages of culture medium contening small percentages of agar.
J. Inf. Dis. 1921 - 29 - p.390
45. HASOYA SEIGO.
Tokyo Imp. Un. Sc. Rep. Gov. Inst. for Infect. 1926 - 123 -
46. KALLIO, PORTER.
The metabolisme of cystine and cysteine bu *Proteus vulgaris* and
proteus morgani.
J. Bact. 1950 - 60 - p.607
47. KASSEL B., BRAND E.
The photometric determination of cystine, cysteine, ascorbic acid
and related compounds with phosphotungstic acid.
J. Biol. Chem. 1938 - 125 - p.115
48. KOLLATH W., QUAST G.
Eine verinfachte Method für Anaerobenzüchtung.
Zentralb. f. Bakt. 1925-I - 95 - p.181
49. KORKES S.
Adaptative conversion of malate to lactate and CO₂ by *lactobacillus*
arabinosus.
J. Biol. Chem. 1948 - 176 - p.463
50. KOVACS N.
Untersunchungen über die aërobe Züchtung der obligaten anaeroben
Bakterien.
Zentralb. f. Bakt. und Parasit. 1924-J abt, 92 - p.580
51. LEPPER E., MARTIN C.J.
The chemical mecanisms exploited in the use of meat media for cul-
tivation of anaerobes.
Brit. J. Exp. Path. 1929 - 10 - p.327

52. LEVITON A.
A simplified laboratory check valve and its application in the construction of anaerobic culture tubes.
Science 1944 - 22 - p.455
53. LEWIS H., TARR A.
The anaerobic decomposition of l-cystine by washed cells of proteus vulgaris.
Biochem. J. 1933 - 27 - T.I p.759
54. LIBORIUS.
Beiträge zur kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien.
Zeitschr. f. Hyg. 1886 - I - p.115
55. LWOFF A., ANDUREAU A., CAILLEAU R.
Oxydation bactérienne de l'acide l-malique en présence d'un inhibiteur de l'oxydation de l'acide oxalacétique.
C.R. Acad. Sciences 1947 - 224 - p.303
56. LWOFF A., IONESCO H.
Production bactérienne directe d'acide pyruvique aux dépends de l'acide malique.
C.R. Acad. Sciences 1947 - 224 - p.678
57. Mc CLUNG L.S., Mc COY E., FRED E.B.
Study on anaerobie bacteria. Further extensive use of the vegetable tissue anaerobie system.
Zentralb. f. Bakt. 1935-II Abt, 91 - p.225
58. Mc CLUNG L.S.
Thioglocollate media for the cultivation of pathogenic Clostridia.
J. Bact. 1943 - 45 - p.58
59. Mc INSTOSH J.
The classification and study of the anaerobie bacteria of war wounds.
Med. Research Council Spec. Rpt. Ser. 1917 - 12 - p.1
60. Mc LEOD J.W., GORDON G.
The production of organic compounds of sulfur in bacterial cultures with special reference to glutathione.
Biochem. J. 1924 - p.936
61. MALIN B., FINN B.K.
The use of a synthetic resin in anaerobic media.
J. Bact. 1951 - 62 - p.349
62. Manual of methods for pure Culture Study of Bacteria.
Society American Bacteriologists. Geneva N.-Y. 1948
63. MEIDENGER F.
Un composé sulfuré, le thiomalate de sodium, comme substance protectrice dans les intoxications mercurielles, arsenicales, saturnines.
Ann. de Dermatologie 1947 - N° 12 - p.457
64. MEIDENGER F., KOLSKY M.
Action du thiomalate de sodium dans l'insuffisance hépatique expérimentale du lapin.
C.R. Soc. Biol. 1948 - 142 - p.776

65. MEIDENGER F.

Action protectrice du thiomalate de sodium dans les intoxications arsenicales, mercurielles, plombiques et par les hydrocarbures halogénés.

Le Médecin d'Usine N°9 - 1948 -

Archives Mal. Profess. de Med. du Travail et S.S. 1949 - 10 - p.42

Archives Int. Pharmacol. et Terap. 1948 - 76 - p.351

66. MESSING.

The oxidation-reduction potentiel of the butyric bacillus in presence of sulphydryl compounds.

Biochem. J. 1934 - 28 - p.1894

67. MORTON K., BREWER J.H., PEREZ J.E., DAY B.

Inactivation of influenza virus by mercurials and reactivation by sodium thioglycollate et B.A.L.

J. of Immunol. 1948 - 59 - p.3135

68. NORDMANN J., JUDE A., NORDMANN R., SERVANT P., GAUCHERY O.

Action de certains inhibiteurs sur l'activité enzymatique bactérienne.

Rev. Immunol. 1952 - 16 - p.166 et p.286

69. PASTEUR L.

Animalicules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations.

C.R. Acad. Sciences 1861 - 52 - p.346

70. PASTEUR L.

Recherches sur la putréfaction.

C.R. Acad. Sciences 1863 - 56 - p.1189

71. PASTEUR L.

Recherches sur la putréfaction. Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations.

C.R. Acad. Sciences 1878 - 87 - p.34

72. Pharmacopoeia Internationalis 1951

Appendice 35 - p.374

73. PLOTZ H., GELOSO.

Relations entre la croissance des micro-organismes anaérobies et le potentiel du milieu de culture.

Ann. Inst. Pasteur 1930 - 45 - p.613

74. PREVOT.

Culture des anaérobies en milieu non désaéré et à l'air libre en présence de réductone.

Ann. Inst. Pasteur 1948 - 75 - p.77

75. QUASTEL J.H., STEPHENSON M.

Experiments on strict anaerobes.

Biochem. J. 1926 - 20 N°2 - p.1124

76. RANSMEIER J., SCHAUB I.G.

Direct cultivation of bacterium tularense from human blood drawn during life and at autopsy.

Arch. Inter. Med. 1941 - 68 - p.747

77. RANSMEIER J., STEKOL.
Effect of sulfur containing compounds on growth and hydrogen sulfide products by *B. tularensis*.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1942 - 51 - p.86
78. REID R., BOWDITCH.
The use of thioglycollate medium in diagnostic bacteriology.
J. Lab. Clin. Med. 1942 - 27 - p.671
79. RITTER.
Zentralb. f. Bakt. 1907 - Abst II - 2 - p.20
80. ROUX.
Sur la culture des microbes anaerobies.
Ann. Inst. Pasteur 1881 - 2 - p.49
81. SEDALIAN P., MARRAL R., CARRAZ M., ARCHINET M., DETOLLE P.
Emploi d'un milieu au thiomalate de sodium (3606 R.P.) dans la culture des microbes anaerobies.
C.R. Soc. Biol. 1949 - 143 - p.1090
82. SHINOHARA K.
The determination of thiol and disulfid compounds, with special reference to cysteine and cystine.
J. of Biol. Chem. 1937 - 120 - p.743 & 1935 - 109 - p.665
83. SIMON R.D.
Antagonisation of the antibacterial action of neoarsphenamine penicillin and streptomycin by -SH compounds.
Brit. J. Exp. Path. 1948 - 29 - p. 202
84. TAROZZI G.
Ueber ein leicht in aërober Weise ansführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaeroben gehaltenen Keimen.
Zentralb. f. Bakt. u. Parasit. 1905 - I abt 38 - p.619
85. TARR H.L.A.
The enzymatic formation of hydrogen sulfide by certain heterotrophic bacteria.
Biochem. J. 1933 - 27 - N°2 p.1869 & 1934 - 28 - p.192
86. THIERS, PELLERAT.
Le thiomalate de sodium. Ses indications thérapeutiques.
Société Médicale des Hôpitaux de Lyon. Séance 20-12-1948
87. TRENMANN.
Das wachstum der anaeroben bakterien.
Zentralb. f. Bakt. u. Paras. 1898 - 23 - p.1038
88. TUDORANU G., TOPORAS P., PAVELESCU C.
Une nouvelle action des sulfamides. Rôle des groupes thiols.
Sang 1949 - 20 - p.427
89. VERRA H.
A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia.
J. Bact. 1944 - 47 - p.59

90. VIGNAL.

Sur un moyen d'isolation et de culture des microbes anaérobies.
Ann. Inst. Pasteur 1887 - 1 - p.359

91. WEINBERG, CUISBOURG.

La culture des germes anaérobies.
Bull. Inst. Pasteur 1925 - 23 - p.689

92. WERY J.

Culture des microbes anaérobies sur gélose au sang inclinée en présence de levure.
C.R. Soc. Biol. 1948 - 142 - p.1084.

93. WOLKMAN.

Relation entre le pouvoir de synthétiser la proline et la résistance au bactériophage chez les mutants d'E. coli.
Ann. Inst. Pasteur 1947 - 73 - p.348

